

STRUKTUR UND FUNKTION DES
LICHTSAMMELKOMPLEXES LHC-II DER
HÖHEREN PFLANZEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von
Hans Rogl
aus Landshut

Frankfurt, im Jahre 2000

INHALTSVERZEICHNIS

<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	5
<i>ABSTRACT IN ENGLISH</i>	6
<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	8
<i>1 Einleitung</i>	<i>11</i>
1.1 Photosynthese	11
1.2 Photosynthetische Reaktionszentren	12
1.3 Antennensysteme	13
1.4 Organisation und Aufbau der LHC Komplexe	17
1.4.1 Supramolekulare Organisation	17
1.4.2 Aufbau und Pigmentbindung der LHC Komplexe	19
1.4.3 Carotinoide in LHC Komplexen	20
1.5 LHC-II: Von der Isolierung zur Struktur	20
1.6 Struktur und Funktion des LHC-II	22
1.7 Faltung von LHC-II	27
1.8 Spektroskopie von Chlorophyllkomplexen	30
1.9 Zielsetzung der Arbeit	35
<i>2 Material und Methoden</i>	<i>37</i>
2.1 Präparation von nativem LHC-II	36
2.2 Aufreinigung von Pigmenten	36
2.2.1 Totalextraktion von Pigmenten	36
2.2.2 Chlorophyllfällung	37
2.2.3 Carotinoidreinigung	37
2.2.4 Trennung von Chlorophyll a und Chlorophyll b	37
2.2.5 Trennung der Carotinoide	38
2.3 Molekularbiologie	39
2.3.1 Genetisches Ausgangsmaterial	39
2.3.2 Herstellung von Punktmutanten	39
2.4 Proteinexpression	41
2.4.1 Anzucht der Bakterien	41
2.4.2 Reinigung von Einschußkörpern	41
2.5 <i>In vitro</i> Faltung von LHC-II	42
2.5.1 Faltung von LHC-II Trimeren durch Detergenzpräzipitation	42
2.5.2 Faltung von LHC-II Trimeren mittels Ni-Säule	42
2.6 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	43
2.7 Nativgelelektrophorese mit Pigmentextraktion	44
2.8 Denaturierende SDS-Gelelektrophorese	44
2.9 Western Blot	44
2.10 Agarosegelelektrophorese	45
2.11 Pigmentanalyse	45
2.11.1 Photometrische Pigmentanalyse	45
2.11.2 Pigmentanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	46
2.12 Spektroskopische Analysen	46

2.12.1	Absorptionsspektroskopie	46
2.12.2	Subbandenanalyse der Absorptionsspektren	47
2.12.3	Fluoreszenzspektroskopie	47
2.12.4	Circulardichroismus	48
2.13	Strukturelle Analyse	48
2.13.1	Zweidimensionale Kristallisierung von rekombinantem LHC-II	48
2.13.2	Elektronenmikroskopie von zweidimensionalen Kristallen	48
2.13.3	Bildprozessierung	48
2.14	Chlorophyllaustausch an nativem LHC-II	49
2.15	Materialien	49
2.15.1	Bezugsquelle für Chemikalien	49
2.15.2	Firmenverzeichnis	51
3	<i>Ergebnisse</i>	52
3.1	Expression des Lhcb1*2 Polypeptids in E. coli	52
3.2	Faltung von trimerem LHC-II	53
3.2.1	Faltung durch Detergenzpräzipitation und -dialyse	53
3.2.2	Faltung auf einer Nickel-Affinitätsäule	54
3.3	Eigenschaften des in vitro gefalteten LHC-II - Nachweis des nativen Zustandes	57
3.3.1	Quartärstruktur	57
3.3.2	Spektroskopie	60
3.3.3	Kristallisation	62
3.4	Auftrennung der Pigmente	66
3.5	Spezifität der Pigmentbindung im LHC-II	68
3.5.1	Chlorophyll a versus Chlorophyll b im rekombinanten LHC-II	68
3.5.2	Chlorophyllaustausch am nativen LHC-II mit Chlorophyllderivaten	70
3.5.3	LHC-II mit nur einer Carotinoidspezies	76
3.5.4	LHC-II Trimere ohne Chlorophyll a	81
3.5.5	Minimale Pigmentanforderung zur LHC-II Faltung	84
3.6	Pigmentbindungsmutanten des rekombinanten LHC-II	85
3.6.1	Faltung der Mutanten	85
3.6.2	Pigmentanalyse der Mutanten	86
3.6.3	Absorptionsspektren der Mutanten	91
3.6.4	Fluoreszenzspektren der Mutanten	97
4	<i>Diskussion</i>	99
4.1	Expression und Faltung durch Metallaffinitäts-Chromatographie	99
4.2	In Vitro Rekonstitution des LHC-II	101
4.3	Spezifität der Pigmentbindung	103
4.3.1	Bindungsspezifität für Chl a und Chl b	103
4.3.2	Bindung von Chlorophyllderivaten	104
4.3.3	Carotinoide im LHC-II: Bindungsspezifität, Lokalisation, Funktion	106
4.4	Chlorophyllzuordnung durch mutierten LHC-II	110
	Trimerisierung der Mutanten	111
4.4.2	Quantifizierung der Pigmente und des Polypeptids	112
4.4.3	Zuordnung der Chlorophyll-Bindestellen	113
4.4.4	Bindungsstelle für Neoxanthin	115
4.4.5	Vergleich mit anderen Arbeiten	116
4.5	Spektroskopische Zuordnung der Chlorophylle	120
4.6	Spektroskopisches Modell für den LHC-II	123
4.7	Ausblick	128

ANHANG

A.	Strukturformenln photosynthetischer Pigmente	130
B.	LHC-his Sequenz	133
C.	Plasmidkarte und Sequenz des D7f3 Plasmids	134
D.	CD-Banden des LHC-II, Literaturwerte	136

<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	<i>137</i>
-----------------------------	------------

<i>Lebenslauf und Publikationsliste</i>	<i>147</i>
---	------------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Anmerkung: für chemische Verbindungen wurde grundsätzlich die Schreibweise mit c statt z verwendet, Kommazahlen wurden wie in der englischen Schreibweise mit Punkt angegeben, so dass Aufzählungen leichter lesbar sind.

A	Absorption
ATP	Adenosintriphosphat
BChl	Bakteriochlorophyll
Chl	Chlorophyll
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
FWHM	full width at half maximum (Halbwertsbreite einer spektralen Banden)
EM	Elektronenmikroskop
IPTG	Isopropylthiogalactosid
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie)
K	Kelvin
LHC	Light harvesting complex
O.D.	Optische Dichte
ODS	Octadecylsilica
p.a.	pro analysi/ zur Analyse
PDB	Protein Data Bank
Phäo	Phäophytin
PCR	Polymerase chain reaction
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tricine	N-tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
R.T.	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulphate (Natriumdodecylsulfat)

ABSTRACT IN ENGLISH

Light-harvesting complex II (LHC-II) serves as a light antenna for the photosynthetic reaction centre II and is the most abundant protein in the chloroplast thylakoid membrane system. The complex is an integral membrane protein and binds various carotenoid and chlorophyll pigment molecules: they absorb light energy and transfer it via specific pathways and with ultrafast kinetics (femtoseconds) towards the photosynthetic reaction centre. The LHC-II complex is the only light-harvesting complex of higher plants of which a structure is known to almost atomic resolution at 3.4 Å. However the exact nature of the individual chlorophylls being of type *a* or *b* and the localisation of some carotenoids could not be determined at this resolution.

The aim of the project was to assign the pigments by biochemical characterisation of mutant complexes, which would lack individual pigments. Previous mutational studies, which used several truncated versions of the polypeptide failed to generate complexes with altered pigment-binding stoichiometry. In the current approach such complexes were generated by selectively mutating the amino acids which were known from the structure to bind to the chlorophylls' central Mg^{2+} atoms. This was possible by expressing poly-histidine-tagged polypeptides in *E. coli* as inclusion bodies and refolding them by a newly developed protocol on a nickel-affinity column. It enabled the folding, binding of pigments and oligomerisation to trimers of the complex in one biochemical step. This system seems to be feasible also for the reconstitution of other proteins difficult to refold, as the binding to the column material via the histidine-tag mimics physiological chaperon function. The functional state of the recombinant protein was checked by several means: the pigment content analysed by high-performance liquid chromatography was identical to the native complex as well as the absorption spectrum exhibiting several characteristic peaks at liquid helium temperature (4K). A complete energy transfer from the short wavelength chlorophyll *b* to the longest wavelength chlorophyll *a* molecule could be demonstrated in a fluorescence energy transfer experiment. The recombinant protein furthermore was induced to form two-dimensional crystals, their analysis in the electron microscope proved after image processing that they were identical to crystals of plant-isolated protein.

Pigment exchange studies with chlorophyll derivatives, differing either in the central metal atom or in the porphyrin ring structure showed that the central atom was most important for binding to the complex. Mutants were constructed which lacked the amino acid residue that

binds the central Mg^{2+} atom of a particular chlorophyll in the wildtype. HPLC analysis showed that they had indeed lost about one chlorophyll molecule per monomer. It was found that some of these mutants had lost not only chlorophyll but were also reduced in their neoxanthin content, giving a hint about the localisation of the third stoichiometrically bound carotenoid neoxanthin, which had remained obscure in the structure. The approach with the site-directed mutants led not only to the assignment of the individual binding pockets to chlorophyll *a* or *b*, but also revealed the exact wavelength at which the missing chlorophyll was absorbing. Using the difference spectra as a guideline a decomposition of the absorption spectra was calculated in a way that the absorption spectrum of the complex was generated by an addition of individual pigment sub-bands. This contrasts with the situation in the bacterial light-harvesting complex LH2, where the B850 pigments behave as an excitonically coupled ensemble and cannot be treated as spectroscopically individual molecules. By artificially loading all binding pockets of the pea LHC-II complex with chlorophyll *b* an unusually long wavelength fluorescence was detected. This may be a hint that limited excitonic coupling occurs in the plant complex as a result of closely spaced chlorophyll *a/b* pairs as revealed in the three-dimensional structure.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Lichtsammelkomplex II (LHC-II) dient als Lichtantenne für das photosynthetische Reaktionszentrum II der höheren Pflanzen. Seine Trimere stellen das häufigste Protein in der Thylakoidmembran dar. Ungefähr die Hälfte des Chlorophylls der Pflanze befindet sich in diesem Komplex. Der LHC-II ist ein integrales Membranprotein und bindet neben Chlorophyll *a* und *b* auch verschiedene Carotinoide. Seine Pigmente absorbieren Licht und geben die dadurch aufgenommene Energie an die photosynthetischen Reaktionszentren weiter, wo sie ausgehend von einer Ladungstrennung chemisch konserviert wird. Die Weiterleitung der Anregungsenergie im LHC-II geschieht über spezifische Pfade und mit ultraschneller Kinetik im Femtosekundenbereich. Der LHC-II ist das einzige Antennenprotein der höheren Pflanzen, dessen dreidimensionale Struktur bei einer fast atomaren Auflösung von 3.4Å gelöst wurde. Bei dieser Auflösung war es jedoch nicht möglich, den Unterschied zwischen Chlorophyll *a* und *b* zu bestimmen, außerdem waren nur zwei der insgesamt drei bis vier gebundenen Carotinoide sichtbar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die einzelnen Pigmente, deren Positionen aus der Struktur bekannt waren, nach ihrer chemischen Natur zuzuordnen. Hierzu wurden mutierte Komplexe untersucht, bei denen jeweils ein bestimmtes Chlorophyllmolekül fehlte. Dies wurde durch Punktmutationen im Polypeptid erreicht, bei denen diejenige Aminosäure ausgetauscht war, an die ein bestimmtes Chlorophyllmolekül über das zentrale Mg^{2+} Atom gebunden war.

Die veränderten Proteine wurden durch ortsgerichtete Mutagenese und Überexpression des Polypeptids in *E. coli* hergestellt, wo sie ohne die Pigmente aggregiert in Einschlusskörpern vorlagen. Die Rückfaltung in Gegenwart von Pigmenten und Detergenzien erfolgte auf einer Nickel-Affinitätssäule, an die das LHC Protein mittels einer Hexa-Histidinmarkierung gebunden war. So konnte in einem biochemischen Schritt das Protein gefaltet, die Pigmente inkorporiert und die native, trimere Form gebildet werden. Die Rückfaltung von histidinmarkierten Proteinen auf Metallaffinitätssäulen kann als generelle Methode auch für andere, schwierig zu faltende, lösliche und Membranproteine angewandt werden.

Der native Zustand des rückgefalteten LHC-II wurde folgendermaßen bewiesen: Der Pigmentgehalt, der durch HPLC Analyse bestimmt worden war, war identisch zum nativ isolierten Protein. Auch ein Absorptionsspektrum zeigte bei 4K die charakteristische Aufspaltung in mehrere Chlorophyllmaxima. Es konnte gezeigt werden, dass in einem

Fluoreszenzexperiment die Anregungsenergie, die bei kurzwelligem Chlorophyll *b* eingestrahlt wurde, im Komplex komplett auf das langwelligste Chlorophyll *a* übertragen wurde. Schließlich wurden aus dem rekombinanten Protein zwei-dimensionale Kristalle erzeugt, deren elektronenmikroskopische Projektionsbilder identisch zu denen des Nativproteins waren.

Der Austausch der Chlorophylle an einigen Bindungsstellen durch Chlorophyllderivate, die entweder im Zentralatom oder in der Porphyrinringstruktur verändert waren, zeigte, dass das Zentralatom den entscheidenden Faktor zur Stabilisierung der Chlorophyllbindung darstellt.

Es wurden neun Mutanten erzeugt, bei denen jeweils derjenige Aminosäurerest ausgetauscht war, von dem aus der Struktur bekannt war, dass er den fünften Liganden für das zentrale Mg^{2+} Atom eines bestimmten Chlorophylls darstellt. Die HPLC Analyse ihrer Pigmente zeigte, dass die Mutanten tatsächlich jeweils ungefähr ein Chlorophyllmolekül verloren hatten; dies diente dazu, die jeweilige Bindungstasche zu Chl *a* oder Chl *b* zuzuordnen. Nur sechs Mutanten bildeten Trimere, ihre biochemischen Daten zeigten, dass die in der Struktur vorgenommene Zuordnung bis auf das Chl *b3* korrekt war. Einige Chlorophyllmutanten waren auch in ihrem Gehalt an Neoxanthin reduziert, daraus konnte die ungefähre Lage des Neoxanthins in der Nähe der Helix C abgeleitet werden.

Die mutierten Proteine lieferten nicht nur die Zuordnung einer Bindungstasche zu einem bestimmten Chlorophylltyp, sondern es konnte aus den Differenzspektren im Vergleich zum Wildtyp auch die Wellenlänge eines bestimmten Chlorophylls abgeleitet werden. Um eine höhere spektrale Auflösung zu erzielen, wurden die Spektren bei 4K aufgenommen. Die Zuordnung einzelner spektraler Banden zu bestimmten Chlorophyllen zeigte, dass in einer bestimmten Bindungstasche nur entweder Chlorophyll *a* oder Chlorophyll *b* gebunden war, da sich nur eine einzige Differenzbande im Spektrum ergab. Weiterhin implizieren die gefundenen Einzelbanden, dass die Pigmente keiner starken excitonischen Kopplung unterliegen, wie dies zum Beispiel im B850 Ring des bakteriellen Lichtsammelkomplexes der Fall ist. Bei LHC-II Komplexen, die nur mit Chlorophyll *b* rückgefaltet worden waren, zeigte sich eine ungewöhnlich langwellige Fluoreszenz bei 77K. Dies könnte auf eine räumlich limitierte Kopplung eines einzelnen Chlorophyllpaares hinweisen.

Bei der Mutante der Chl *a2* Bindungsstelle zeigte sich, dass dies das langwelligste der untersuchten Pigmente war. Der zugehörige Komplex war auch der einzige, bei dem die Fluoreszenz ins Kürzerwellige verschoben war. Die Lage des Chlorophylls *a2* an der

Außenseite des Proteins ist prädestiniert für die Energieübertragung zum photosynthetischen Reaktionszentrum oder zu benachbarten LHC Komplexen.

1 Einleitung

1.1 Photosynthese

Der Aufbau geordneter und informationstragender Strukturen ist auf Grund der thermodynamischen Gesetze nur durch den Verbrauch von Energie möglich. Dies spiegelt sich in den unterschiedlichsten Bereichen wider, z.B. sehr augenscheinlich bei Computern und elektronischen Speichermedien, wo der geordnete Fluss von Elektronen direkt die komplexe Funktion bestimmt. Das Prinzip des Fliessens von geladenen Teilchen ist auch in der Biologie für die Informationsübertragung in Nervenzellen verantwortlich. Der Fluss von Energie als Grundlage für den Aufbau von Ordnung und Information lässt sich in der Funktionsweise eines ganzen lebenden Organismus nachweisen, ebenso spricht man in einem Ökosystem von Stoffkreisläufen und Energieflüssen. Die Entwicklung der menschlichen Gesellschaft ist ohne Energieresourcen nicht denkbar: Der Energieverbrauch der Weltbevölkerung hat sich laut Worldwatch Institute in den letzten 50 Jahren verfünffacht; dieser ist mitverantwortlich für einen Temperaturanstieg der Erdatmosphäre, der nach neusten Messungen für die letzten 25 Jahren mit 2°C pro Jahrhundert beziffert wird (Frankfurter Rundschau, 24.2.2000, Nr.46, S.38). Praktisch der gesamte Energieverbrauch des Lebens auf der Erde, wie wir es heute kennen, wird durch Photosynthese gedeckt. Hierbei kann angemerkt werden, dass die anthropogene Klimaveränderung mit ihren weitreichenden Folgen für die Spezies Mensch als vernachlässigbar erscheint, wenn man sie mit derjenigen vergleicht, die vor über zwei Milliarden Jahren durch die oxygene Photosynthese ausgelöst wurde: Die Fixierung atmosphärischen Kohlendioxids bewirkte einen „umgekehrten“ Treibhauseffekt. Viel gravierender war jedoch die Anreicherung des aggressiven und primär toxischen Gases Sauerstoff, das nun ein fünftel unserer Atmosphäre bildet (Nunn, 1998). Der Sauerstoff in der Atmosphäre ermöglichte nicht nur die Entwicklung der Atmung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor, sondern führte auch zur Ausbildung einer UV abschirmenden Ozonschicht in der Stratosphäre (Garciapichel, 1998); dies war wahrscheinlich ein entscheidender Faktor, um die Entwicklung höherer Lebewesen zu ermöglichen.

Unter Photosynthese versteht man den Aufbau organischer Materie durch Lichtenergie (Strasburger, 1991). In der Primärreaktion werden organische oder anorganische Verbindungen lichtgetrieben oxidiert, so z.B. Wasser zu Sauerstoff in der oxygenen

Photosynthese. Die durch Lichtenergie abstrahierten Elektronen werden in einer Elektronentransportkette auf Elektronenträgermoleküle übertragen, so dass diese als Reduktionsäquivalente in biochemischen Reaktionen zur Verfügung stehen (Barber & Andersson, 1994). Sie können dann dazu verwendet werden, um atmosphärisches Kohlendioxid zu organischen Verbindungen, z.B. Zucker, zu reduzieren. Hierzu wird zusätzliche Energie benötigt, welche ebenfalls durch die Photosynthese erzeugt wird: Der Elektronenfluss ist an die Erzeugung eines elektrochemischen Gradienten über die biologische Membran gekoppelt (Mitchell, 1976). Dieser wird in einem fundamentalen biologischen Prozess dazu genutzt, um mit Hilfe eines molekularen Motors/Generators das energiereiche Molekül ATP zu erzeugen (Noji et al., 1997), welches in verschiedensten Enzymreaktionen benutzt wird, um thermodynamisch energieverbrauchende Vorgänge und chemische Reaktionen anzutreiben.

Der elektrochemische Gradient über die Membran dient zusätzlich als Energiequelle für Transportprozesse, und ermöglicht so eine Kompartimentierung in einem Organismus.

1.2 Photosynthetische Reaktionszentren

Um die komplexen photo- und elektrochemischen Reaktionen der Photosynthese zu ermöglichen, sind lichtabsorbierende und redoxaktive Moleküle oder Atome in der Proteinmatrix der photosynthetischen Reaktionszentren exakt zueinander positioniert (Deisenhofer et al., 1985). Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, wird im photosynthetischen Primärprozess ein Chromophor durch Absorption eines Lichtquants in einen angeregten Zustand gebracht. Dieser besitzt ein deutlich negativeres elektrochemisches Potential, und ermöglicht somit die Abstraktion eines Elektrons durch die benachbarten Cofaktoren. Über weitere Elektronenträger wird es in der Elektronentransportkette weitergeleitet. Alle bekannten Reaktionszentren lassen sich auf Grund ihrer Sequenz und ihres Aufbaus in zwei Klassen (I und II) einteilen, die auch untereinander strukturelle Homologie zeigen (Nitschke & Rutherford, 1991; Schubert et al., 1998). Nur Cyanobakterien und Pflanzen besitzen gleichzeitig beide Reaktionszentren der Klassen I und II. Man geht im allgemeinen davon aus, dass nur diese Kombination es ermöglicht, das inerte Molekül Wasser zu Sauerstoff zu oxidieren, welches mit -0.8V ein sehr negatives elektrochemisches Potential besitzt. Durch die in Reihe Schaltung beider Photosysteme bei den sauerstoffentwickelnden Organismen wird ein deutlich höheres Potential durchspannt und genutzt, als bei den Purpurbakterien und grünen Schwefelbakterien, die jeweils nur ein Photosystem besitzen.

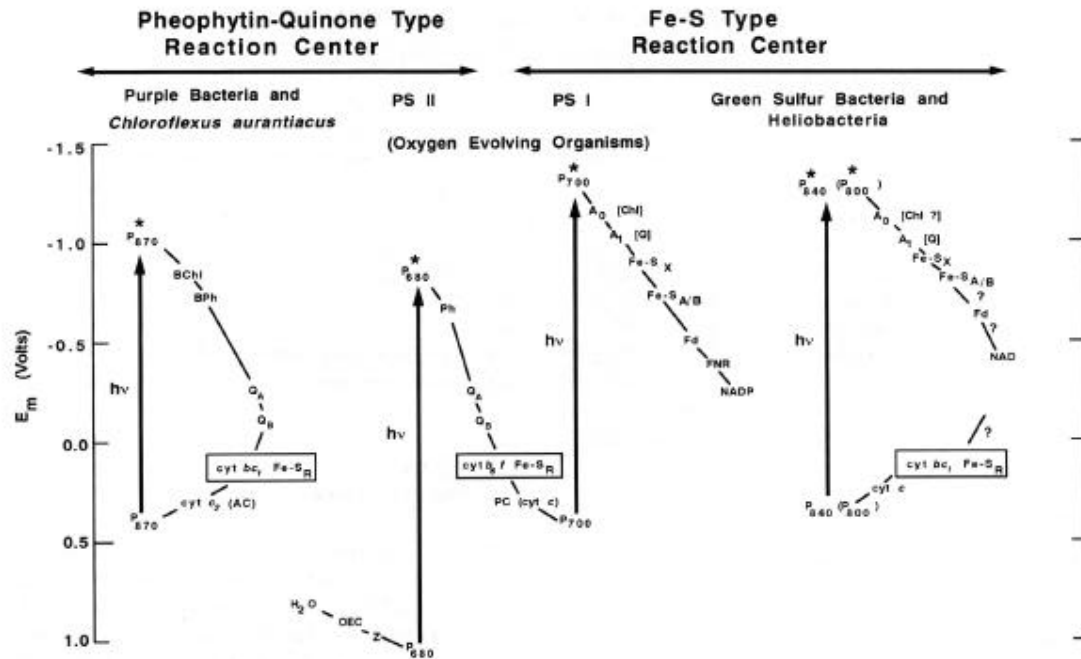


Abb. 1 Phylogenetische Einteilung der Reaktionszentren. Die energetische Anregung des Photosystems ist mit Hilfe der dicken Pfeile dargestellt, weiterhin sind die Komponenten der damit verbundenen Elektronentransportkette ersichtlich. B...: Bakterio-, Chl: Chlorophyll, Ph: Phäophytin, Q: Chinon, cyt: Cytochrom, PC: Plastocyanin, Fd: Ferredoxin, FeS: Eisenschwefelzentren, OEC: oxygen evolving complex. Entnommen aus Blankenship, 1992.

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der photosynthetischen Komplexe stellt eine unverzichtbare Grundlage unseres Verständnisses der Photochemie der Reaktionszentren dar, so sind die Strukturen des bakteriellen Reaktionszentrums des Typs II (Deisenhofer et al., 1985) und des pflanzlichen Reaktionszentrums P700 des Typs I (Krauß et al., 1996) bekannt. Eine hochaufgelöste Struktur des wasserspaltenden P680 Enzyms der Pflanzen vom Typ II stellt eine der großen Herausforderung der kommenden Jahre dar, eine Struktur niedriger Auflösung ist jedoch schon jetzt verfügbar (Rhee et al., 1998).

1.3 Antennensysteme

Um bei schwächerem Licht die Photosyntheserate zu erhöhen, also z.B. im Schatten oder in größerer Wassertiefe, sind die photosynthetischen Reaktionszentren mit Lichtantennen ausgestattet (Gannt, 1996). Chloroplasten, die keine Chlorophyll *a/b* Komplexe besitzen, zeigen deshalb nur bei Schwachlicht eine erniedrigte Photosyntheserate (Boardman & Highkin, 1966). Die Aufgabe der Antennekomplexe besteht darin, Lichtquanten zu absorbieren und die Anregungsenergie an das redoxaktive Zentrum des Photosystems weiterzuleiten, welches bei Pflanzen und Cyanobakterien aus zwei Chlorophyll *a* Molekülen

gebildet wird. Auf diese Weise kann der effektive Absorptionsquerschnitt eines einzelnen Reaktionszentrums deutlich erhöht werden: Während die intrinsische Antennengröße des Photosystems II nur 37 Chlorophyll Moleküle beträgt, erhöht sich dieser Wert durch die angegliederten LHC Komplexe auf bis zu 500 unter physiologischen Schwachlichtbedingungen (Melis, 1996).

Wie in Kapitel 1.2 dargestellt, lassen sich alle photosynthetischen Reaktionszentren den Klassen I oder II zuordnen. Sie besitzen bereits ein internes Antennensystem, das aus zwei Chlorophyll *a* bindenden Proteindomänen besteht. Im Photosystem I sind dies die N-terminalen Verlängerungen der zentralen Polypeptidketten PSI A und PSI B. Im Photosystem II werden sie von den eigenständigen Polypeptidkette CP43 und CP47 gebildet, welche in Aufbau und Aminosäuresequenz Homologie mit den Photosystem I Domänen aufweisen. Die Antennen dieses Typs werden jeweils aus 6 Transmembranhelices gebildet und binden ca. 13-15 Chl *a* Moleküle (Schubert et al., 1998). Somit besitzen beide photosynthetischen Reaktionszentren der Pflanzen/ Cyanobakterien bereits ein internes Antennensystem. Alle photosynthetischen Organismen besitzen jedoch noch weitere Antennen, die im folgenden kurz beschrieben werden:

Im Gegensatz zu den photosynthetischen Reaktionszentren, weisen die Antennensysteme eine

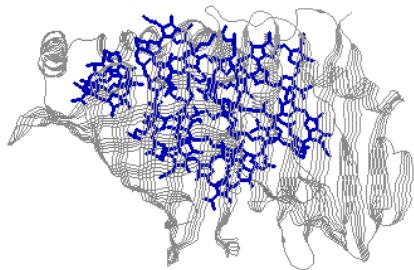


Abb. 2: FMO Protein (Monomer) der grünen Schwefelbakterien. Bchl *a* in blau.

weit größere Vielfalt auf: Bei den grünen Schwefelbakterien sind Aggregate von Bakteriochlorophyll *c* in sogenannten Chlorosomen organisiert (Staehelin et al, 1980). Diese leiten die absorbierte Lichtenergie über das lösliche, Bakteriochlorophyll *a* bindende FMO Protein an das Reaktionszentrum weiter. Da das FMO Protein bereits bei einfacher Aufkonzentrierung dreidimensionale Kristalle bildet, war es das erste Chlorophyll-bindende Protein, dessen Kristallstruktur gelöst wurde

(Fenna & Matthews, 1975). Im FMO Protein sind sieben Bakteriochlorophyll-Moleküle in unregelmäßiger Anordnung, jedoch dicht gepackt, im Inneren des Proteins angeordnet. Die Betafaltblattstruktur bildet einen Käfig, der die hydrophoben Chlorophylle von der wässrigen Umgebung abschirmt. *In vivo* liegt das Protein als Trimer vor und ist eng an das photosynthetische Reaktionszentrum gekoppelt.

Ähnlich wie die Chlorosomen der grünen Schwefelbakterien sind bei den Cyanobakterien und Rotalgen Phycobilisomen an die cytosolische Seite der membranständigen

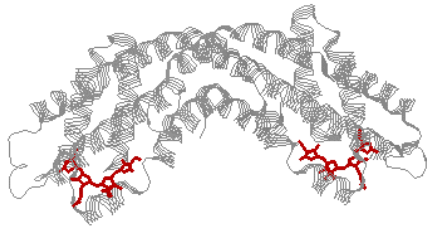


Abb. 3: Phycobiliprotein Phycocyanin (Monomer) der Cyanobakterien, Phycocyanobilin rot

Photoreaktionszentren gebunden. Diese bestehen jedoch nicht aus Bakteriochlorophyll *c* Aggregaten, sondern werden durch lösliche, pigmentierte Proteine gebildet, die in Form von Stäben angeordnet sind und fächerförmig auf die Reaktionszentren aufgesetzt sind. Als Pigmente sind offenkettige Tetrapyrrole, verschiedene Bilin-typen, kovalent und in relativ großem Abstand zueinander an die Proteine gebunden. In diesem Antennensystem wird besonders deutlich, wie ein energetischer Gradient der Chromophore dazu

benutzt wird, die Anregungsenergie von den äußeren Teilen des Komplexes in den Zentralteil zu leiten, wo das Reaktionszentrum lokalisiert ist. Da es sich auch hierbei um lösliche Proteine handelt, sind die Kristallstrukturen von Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin bekannt, die strukturell starke Homologie aufweisen und *in vivo* Trimere oder Hexamere bilden (Duerring et al., 1991, Brejc et al., 1995).

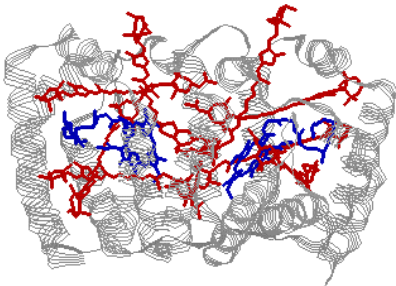


Abb. 4: Monomer der Dinoflagellaten, Carotinoide rot, Bchl *a* blau

Dinoflagellaten (einzellige Algen) besitzen zusätzlich zu den membranständigen LHC Komplexen (siehe unten) das lösliche Peridinin-Chlorophyll-Protein, welches vor allem das Carotinoid Peridinin und zum geringeren Teil Chlorophyll *a* bindet. Auf Grund der trimeren Struktur des Proteins wurde vorgeschlagen (Hofmann et al., 1996), dass es die absorbierte Energie nicht direkt, sondern über die ebenfalls trimeren, jedoch membranständigen LHC-II Komplexe an das Reaktionszentrum weiterleitet. Wie jedoch oben ausgeführt, weisen auch die Phycobilisomproteine und das FMO Protein

trimere Struktur auf, ohne dass eine Verbindung zu LHC-II ähnlichen Antennensystemen besteht.

Vergleicht man das Typ II Reaktionszentrum der Purpurbakterien mit dem der höheren Pflanzen, fällt das Fehlen der „Core-“ Antennen CP43 und CP47 auf. Stattdessen befindet sich das Reaktionszentrum in einem membranständigen, symmetrischen Ring, der aus 16 Untereinheiten der LH1 α - und β -Polypeptide gebildet wird, die Bakteriochlorophyll *a* und Carotinoid binden (Karrasch et al., 1995). Es gibt jedoch auch Hinweise von *Rhodobacter sphaeroides*, dass es sich um einen offenen Ring handelt, der das Reaktionszentrum umschließt (Jungas et al., 1999). Der membranständige, homologe Antennenkomplex LH2 bildet Ringe von 8 oder 9facher Symmetrie, die um das LH1 umschlossene Reaktionszentrum angeordnet sind.

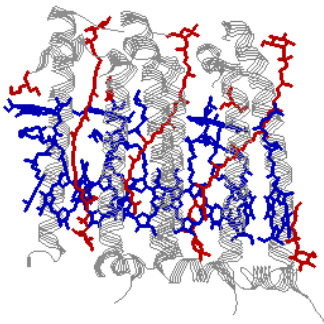


Abb. 6: Drei LH2 Monomere der Purpurbakterien, Bchl *a* blau, Carotinoide rot, Blick aus dem inneren des Rings nach außen. (Mc Dermott et al., 1995)



Abb. 5: Aufsicht auf den LH2 Ring (Oktamer) von *Rhodospirillum rubrum*. (Koepeke et al., 1996)

Neben dem Carotinoid (Rhodopin-glucosid) fällt in der Struktur auf, dass die Bakteriochlorophyllmoleküle in zwei Ebenen im Protein angeordnet sind, wobei die Tetrapyrrolchromophore in einer Ebene senkrecht, und in der anderen parallel zur Membranebene liegen. Auch beim LH1 LH2 System bilden die Chromophorenergien einen Gradienten, der die Anregungsenergie zum Reaktionszentrum hin leitet. Es wurde vorgeschlagen, dass die Ringgeometrie dazu prädestiniert ist, eine korrekte Übertragung der niederenergetischen Infrarotstrahlung zu ermöglichen, die von den Purpurbakterien für die Photosynthese benutzt wird (Cogdell et al., 1996). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die enge Anordnung der Chlorophylle zu einer Delokalisierung der Anregungsenergie im Ring führt, so dass das Energieniveau des Bakteriochlorophylls weiter abgesenkt wird. Bakteriochlorophyll ist einer der wenigen Farbstoffe, die einen elektronischen Übergang im

Infraroten zeigen, und wird deshalb auch in der photodynamischen Krebstherapie eingesetzt (Zilberstein et al., 1997).

Der ebenfalls membranständige LHC-II Komplex der höheren Pflanzen dient wie der LH2 der Purpurbakterien als äußere Antenne. Er liegt jedoch nicht in ringförmiger Anordnung, sondern als Trimer in der Thylakoidmembran vor. Die gebundenen Pigmente, Carotinoide,

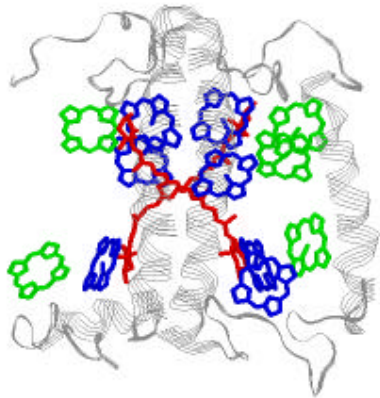


Abb. 7: LHC-II Monomer, Carotinoide rot, Chl *a* blau, Chl *b* grün. Seitenansicht parallel zur Membran, oben Chloroplastenstroma, unten Thylakoidlumen. (Kühlbrandt et al., 1994)

Chlorophyll *a* und *b*, zeigen gewisse Gemeinsamkeiten zum bakteriellen System in ihrer prinzipiellen Anordnung: Die Carotinoide sind membrandurchspannend orientiert, die Chlorophylle in zwei Ebenen gruppiert. Jedoch sind im LHC-II alle Tetrapyrrolmoleküle eher senkrecht zur Membranebene angeordnet. Da eine hohe Symmetrie wie beim bakteriellen LH2 fehlt, kann *a priori* nicht von einer starken energetischen Kopplung ausgegangen werden. In der Abbildung ist gut ersichtlich, dass die den zentralen Carotinoiden (sehr wahrscheinlich Lutein) nahestehenden Chlorophylle als Chlorophyll *a* zugeordnet wurden (siehe Kapitel

1.6); der Unterschied zwischen Chlorophyll *a* und *b* war bei der gegebenen Strukturauflösung nicht erkennbar. Das Carotinoid Neoxanthin, das biochemisch in stöchiometrischen Mengen von einem Molekül pro Monomer nachweisbar ist, ist ebenfalls nicht im Modell enthalten. Vermutlich ist es in der Nähe zur Helix C lokalisiert, die im Bild rechts ist (Rogl & Kühlbrandt, 1999), und bildet einen ähnlichen Winkel wie die zentralen Luteine (Gruszezki et al., 1999, Croce et al., 1999a). Es fällt auch auf, das LHC-II im Gegensatz zu den anderen hier vorgestellten Antennenkomplexen eine wesentlich weniger kompakte Struktur bildet, da durch die Einbettung in die Membran eine Abschirmung der Chlorophylle gegenüber einer wässrigen Umgebung nicht notwendig ist.

1.4 Organisation und Aufbau der LHC Komplexe

1.4.1 Supramolekulare Organisation

Die Organisation der bakteriellen LH Komplexe, die das Typ II Reaktionszentrum P870 der Purpurbakterien umgeben, kann mittlerweile recht gut beschrieben werden: Das

Reaktionszentrum ist in einem hexadecameren Ring von LH1 Komplexen eingebettet, dessen Absorptionsmaximum bei 875nm liegt. Um diese Komplexe herum sind oktamere oder nonamere Ringe von LH2 Komplexen angeordnet, deren Bakteriochlorophylle bei 850nm und 800nm absorbieren. Durch die abfallenden Pigmentanregungsenergien kann ein Fluss der Anregungsenergie hin zum Reaktionszentrum hinreichend erklärt werden (Kühlbrandt, 1995; Fleming & van Grondelle, 1997).

Bei den pflanzlichen Photosyntheseproteinen findet man eine ähnliche, jedoch komplexere Anordnung: Um das Photosystem II Dimer (bestehend aus zwei mal D1 und D2), das bereits

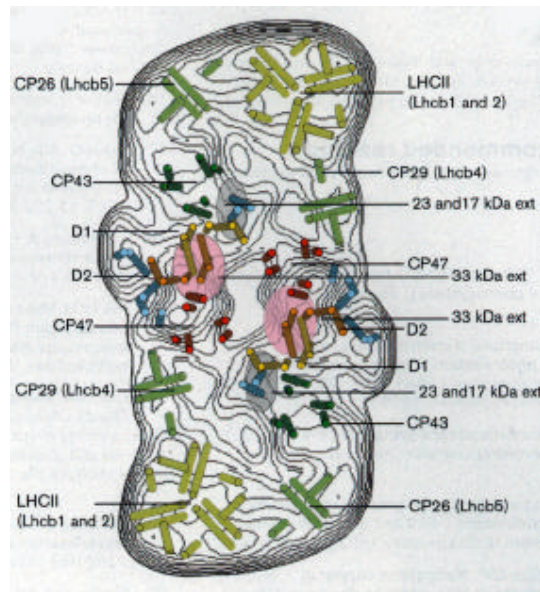


Abb. 8: Modell der Organisation eines PS-II Partikels, eingepasst in die elektronenmikroskopische Abbildung eines isolierten Einzelpartikles, nach Bildmittelung. Barber & Kühlbrandt, 1999.

die internen Antennenproteine CP43 und CP47 enthält, ist eine Schicht von inneren Antennenproteinen aufgebaut, die als minore Antennen bezeichnet werden, da sie in geringerer Anzahl in der Thylakoidmembran enthalten sind. Sie bestehen aus den Proteinen CP24 (Lhcb6), CP26 (Lhcb5) und CP29 (Lhcb4) (Green et al., 1991; Jansson et al., 1992, Jansson et al., 1994). Der Hauptteil der Antennenproteine wird von der äußeren Antenne LHC-II gebildet, die aus den Polypeptiden Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 besteht.

LHC-II stellt ca. $\frac{1}{3}$ des Proteins der Thylakoide, nur ein Teil ist mit dem PS-II fest assoziiert (siehe Abbildung 8). Der andere Teil ist lose an das PS-II gebunden, und kann die

Anregungsenergie bei Übersättigung der PS-II Reaktionszentren auch auf PS-I übertragen (Jansson, et al., 1997). Die Überanregung des PS-II bewirkt eine Erhöhung des Reduktionszustandes der Quinon-Elektronenträger in der Thylakoidmembran; dies führt über den b_6f Komplex zur Aktivierung einer Kinase (Allen et al., 1981; Gal et al., 1990), welche den LHC-II phosphoryliert, und damit zur Ablösung vom PS-II führt (Allen, 1992). Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Ableitung überschüssiger Anregungsenergie als thermische Energie wird als ‚non-photochemical quenching‘ (NPQ) bezeichnet. Dieser Mechanismus wird durch den Anteil bzw. Umwandlung bestimmter Carotinoide, insbesondere Violaxanthin und Zeaxanthin reguliert (Härtel et al., 1996). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass dies stark mit einem weiteren Lichtsammelprotein, dem PS-II

assoziierten Psb S / CP 22 in Zusammenhang steht (Li et al., 2000), vgl. Kapitel 4.3.3. Jedoch enthalten auch viele andere Lichtsammelproteine diese Carotinoide (siehe unten).

Weiterhin findet man in der Thylakoidmembran noch die PS-I assoziierten Komplexe LHC-I-680 und LHC-I-730, die jeweils Dimere aus den Polypeptiden Lhca1/Lhca4 und Lhca2/Lhca3 sind (Schmid et al., 1997; Thornber et al., 1993). Da sich die nachgestellte Zahl auf das Fluoreszenzmaximum bei tiefer Temperatur bezieht, fällt LHC-I-730 durch die besonders langwellig emittierenden Pigmente auf.

1.4.2 Aufbau und Pigmentbindung der LHC Komplexe

Alle beschriebenen Komplexe sind zueinander homolog und bestehen aus drei membrandurchspannenden Helices, so dass die bekannte dreidimensionale Struktur des LHC-II Komplexes als Modell auch für diese Komplexe benutzt wird. Nur das Psb S Protein enthält vier Transmembranhelices: dies wird als Hinweis auf den evolutiven Ursprung der LHC Komplexe gewertet, die aus der Genverdoppelung eines zwei Helix Motives entstanden sind (Green & Kühlbrandt, 1994). Trotz ihrer Homologie und der charakteristischen Organisation weisen die einzelnen Antennen auch Unterschiede auf. Dies betrifft sowohl ihre pigmentbindenden Eigenschaften, als auch ihren Oligomerisierungszustand in der Thylakoidmembran (Tabelle 1):

Komplex	M.W.	Chl a/b	Chlorophyll		Carotinoide			Aggregation	Ref.
			Chl a	Chl b	Lutein	Viola.	Neo.		
LHC-II	25-28	1.4	7	5	2	0.3	1	Trimer	a
CP24	24	1	5	5	1.9	0.9	0	Monomer	b,c
CP26	26	2	6	3	1.3	0.5	0.3	Monomer	b
CP29	29	3	6	2	0.8	0.7	0.5	Monomer	d
LHC-I	21-24	1.9	?	?	+	+	-	Dimer	e
LHC-I-730	21-22	2.5	5	2	0.8	0.4	0	Dimer	f
Psb S	22	6	6	1	0.7	0.3	0.3	Monomer ?	g

Tabelle 1: Pigmentbindung und Oligomerisierungszustand der Lichtsammelkomplexe, Pigmentmoleküle pro Proteinmonomer. Chl = Chlorophyll; M.W. = Molekulargewicht; Viola.= Violaxanthin, Neo.= Neoxanthin a = Butler & Kühlbrandt, 1988, diese Arbeit; b= Bassi *et al.*, 1993; c= Sandona et al., 1998; d= Henrysson et al., 1989; Giuffra *et al.*, 1997; e= Thornber et al., 1993; f= Schmid *et al.*, 1997; g= Funk et al., 1995;

Die minoren Komplexe liegen als Monomere vor, die LHC-I Komplexe als Dimere, während LHC-II Trimere bildet, die wahrscheinlich auch gemischt aus den verschiedenen Polypeptiden Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 zusammengesetzt werden können (Spangfort & Andersson, 1989). LHC-II und CP24 haben den höchsten Chlorophyll *b* Anteil der Antennenkomplexe, wobei über die relative Anordnung von CP24 zum PS-II sehr wenig bekannt ist (Harrer et al., 1998).

1.4.3 Carotinoide in LHC Komplexen

Die LHC Komplexe unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Carotinoidbindung. Da die Carotinoide im sichtbaren Bereich absorbieren und in ihrer Absorption mit der Soret-Bande der Chlorophylle (400-500nm) überlappen, ist eine ihrer Aufgaben die Unterstützung der Lichtsammelfunktion. Eine weitere Funktion ist die Neutralisierung von Chlorophyll Triplet-Anregungszuständen. Chlorophyll Triplets haben eine relativ lange Lebensdauer (ms), und können in Verbindung mit Sauerstoff zur Bildung von äußerst reaktivem und daher toxischen Singulett-Sauerstoff führen. Carotinoide können sowohl die Triplet-Anregung der Chlorophylle extrem schnell übernehmen (0.5ns) und in thermische Energie umwandeln, als auch eventuell entstandenen Singulett Sauerstoff neutralisieren (Schödel et al., 1998). Somit scheint klar zu sein, dass das am häufigsten vorkommende Carotinoid Lutein sowohl Lichtsammel- als auch Schutzfunktion übernehmen kann, außerdem zeigt die zentrale Position der Carotinoide im LHC-II Modell eine essentielle strukturelle Rolle auf. Violaxanthin wird in Verbindung mit einem generellen Mechanismus der Ableitung überschüssiger Anregungsenergie diskutiert, dem ‚non-photochemical-quenching‘. Durch eine pH abhängige De-Epoxidierung des Violaxanthin wird dieses in Zeaxanthin umgewandelt, welches in der Lage ist die Anregung der LHC Komplexe zu löschen (Färber et al., 1997). Auch eine pH Erniedrigung alleine bewirkt jedoch bereits einen Quench Effekt in isolierten LHC-II Komplexen, dessen Stärke ist dann aber abhängig vom gebundenen Carotinoidtyp (Ruban & Horton, 1999). Dieser Regulationsmechanismus soll eine Überanregung des Photosyntheseapparats verhindern, was zur Photoinhibition führt, also eine Verringerung der Photosyntheserate. Auf molekularer Ebene ist hierzu bekannt, dass vor allem die D1 Untereinheit des PS-II geschädigt wird, und einem ständigen Austauschprozess unterliegt (Telfer et al., 1999).

Eine spezielle Aufgabe für Neoxanthin ist bis jetzt nicht bekannt. Isolierter LHC-II hat neben den Chlorophyllen pro Monomer zwei Moleküle Lutein, ein Neoxanthin, sowie substöchiometrischen Mengen Violaxanthin gebunden. Kürzlich wurde von einer Präparation berichtet, die 1 Violaxanthin pro Monomer enthält (Ruban et al., 1999). Der Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit lag in der Charakterisierung der Chlorophyll und Carotinoidbindungsstellen.

1.5 LHC-II: Von der Isolierung zur Struktur

Die Entdeckung und Charakterisierung des LHC-II Komplexes wurde am wesentlichsten von Philip Thornber beeinflusst. Zum Gedenken an sein Lebenswerk und seines Verdienstes für

dieses Wissenschaftsgebiet ist in Abbildung 9 eine Signatur von ihm gezeigt. Im Twyford Photosynthese-Labor in London wurde 1965 das grün gefärbten Spülwasser der Laborgeräte auf ein übriges Gelelektrophoreseröhrchen aufgetragen. Dies führte zu der Auftrennung von grünen Banden im Gel (Thornber, 1995; Thornber et al., 1967). Die elektrophoretische

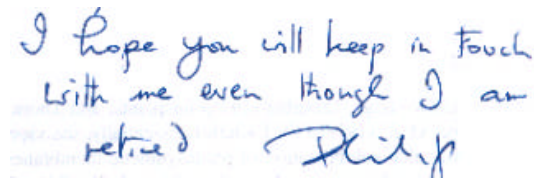


Abb. 9: Philip Thornber's Signatur des Artikels von 1995

Analyse von SDS solubiliserten Thylakoidmembranen wurde jedoch auch von anderen Gruppen durchgeführt (Ogawa et al., 1966). Zu dieser Zeit war aus spektroskopischen Messungen bereits die Existenz der Photosysteme I und II bekannt und ihre biochemische Trennung aus

Detergenz-solubilisierten Membranen war möglich (Boardman & Anderson, 1964). Die Funktion des Photosystem II assoziierten Chl *a/b* Proteins LHC-II wurde erst 1974 aufgedeckt, als sich zeigte, dass Erbsenmutanten, die kein Chl *b* synthetisieren konnten und deshalb dieses Protein nicht besaßen, photosynthetisch normale Aktivität zeigten. Hiermit war klar, dass dieses Protein nicht direkt für den photosynthetischen Prozess wichtig ist, und die Funktion als Lichtsammelkomplex wurde daraus abgeleitet (Thornber & Highkin, 1974).

Für eine Isolation im größeren Maßstab war die Elektrophoresetechnik nicht ausreichend, es erfolgte eine Auftrennung mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von Membranen, die mit Digitonin (Arntzen & Ditto, 1976) oder Triton X-100 (Burke et al., 1978) solubilisiert worden waren. Letztere Methode wird leicht verändert bis heute verwendet. Schon früh war bekannt, dass LHC-II zur Bildung zwei-dimensionaler Kristalle neigt (Kühlbrandt et al., 1983), selbst die einfache Inkubation von Thylakoidmembranen mit Detergenz führt zur Ausbildung von Membrankristallen (Lyon & Miller, 1985). Für den isolierten Komplex konnte gezeigt werden, dass bestimmte Lipide unerlässlich für die Kristallisierung des LHC-II sind (Nussberger et al. 1993), wobei das Lipid Digalactosyl-diacylglycerin für die Kristallisation wichtig ist, während Phosphatidylglycerin für die Ausbildung und die Stabilität von trimeren Komplexen nötig ist. Auch eine drei-dimensionale Kristallisation ist möglich (Kühlbrandt, 1987; Nussberger et al., 1993, Welte et al., 1995), jedoch war bis jetzt die Datenqualität noch nicht ausreichend, um eine Struktur daraus zu berechnen. Eine erste drei-dimensionale Struktur aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen zwei-dimensionaler Kristalle wurde 1984 vorgestellt (Kühlbrandt, 1984; Li, 1985), und kumulierte schließlich in der Berechnung einer Struktur mit fast atomarer Auflösung von 3.4 Å (Kühlbrandt et al., 1994). In dieser Struktur, die im Kapitel 1.6 im Detail beschrieben

ist, sind drei Transmembranhelices und eine membranassoziierte Helix sichtbar. 12 ringförmige Elektronendichten wurden als die Porphyringerüste der Chlorophylle identifiziert. Die Zuordnung nach Chl *a* oder Chl *b* erfolgte je nach räumlicher Nähe zu den zwei Zentralen Carotinoiden. Diese sind im Zentrum in einer offensichtlich wichtigen strukturellen Rolle zu erkennen. Für das dritte, und eventuell vorhandene vierte Carotinoid konnten keine zugehörigen Elektronendichten gefunden werden. Die Erarbeitung einer Struktur mit noch weiter verbesserter Auflösung ist weiterhin von großem Interesse.

1.6 Struktur und Funktion des LHC-II

Die elektronenkristallographische Struktur des LHC-II war die zweite Struktur mit atomarer Auflösung, die mit dieser Methode gelöst wurde (Kühlbrandt et al., 1994, Henderson et al., 1990). Dies war nicht nur ein großer Fortschritt für die hochauflösende Elektronenmikroskopie, sondern auch enorm wertvoll für die Erforschung der Lichtsammelkomplexe der höheren Pflanzen. LHC-II ist das häufigste Membranprotein der Thylakoidmembran und stellt ein Modellsystem für die pflanzlichen Lichtsammelantennen dar. Als wichtigstes Ergebnis für die Deutung der spektroskopischen Untersuchungen kann die Lokalisation der Pigmentmoleküle in der Struktur gewertet werden.

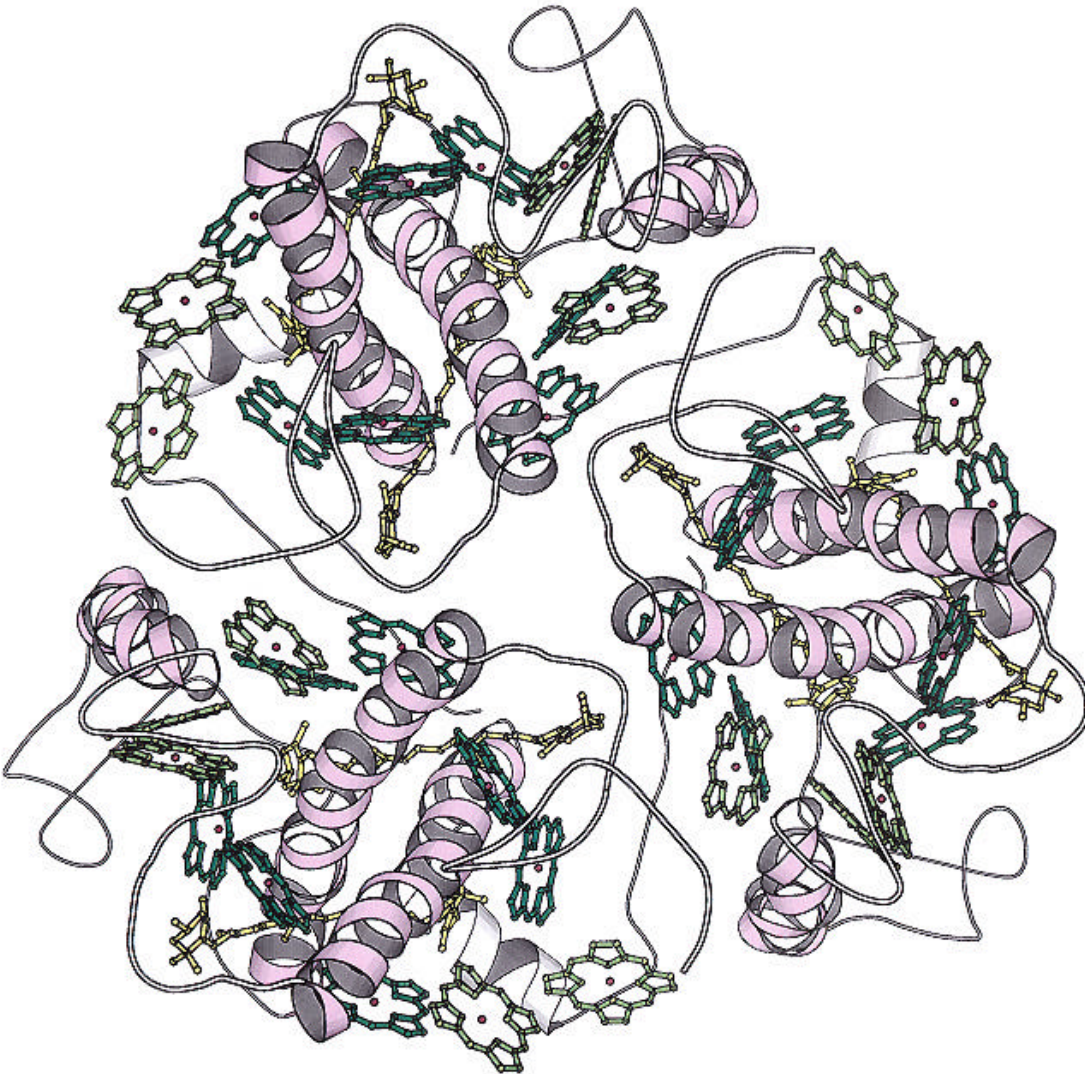


Abb. 10: Strukturmodell des trimeren LHC-II. Carotinoide gelb, Chl *a* dunkelgrün, Chl *b* hellgrün. Ansicht von der stromalen Seite.

Die Struktur des LHC-II zeigt (Abb. 10), dass dieser pro Monomer drei membrandurchspannende Helices enthält, wie dies in einem Hydropathieplot (Kyte & Doolittle, 1982; Rose & Roy, 1980) vorhergesagt wird. Auffällig sind die zwei zentralen Helices A und B, welche relativ zur Membrannormalen um 32° jeweils entgegengesetzt geneigt sind. Beide Helices beginnen N-terminal an der Stromaseite und sind durch die Helix C verbunden, welche die Membran fast senkrecht in einem Winkel von 9° zur Normalen durchspannt. Am C-Terminus befindet sich eine 10 Aminosäuren lange Helix D, welche parallel zur Membran im Bereich der Membranoberfläche läuft. Durch die stark geneigten, und sich fast überkreuzenden zentralen Helices entsteht Raum, in dem die Pigmente gebunden

werden. Diese Anordnung und der hohe Pigmentanteil im LHC-II von ca. 30 Gewichtsprozent bedingt eine relativ offene Struktur. Bei einer raumfüllenden Darstellung des PDB Modells, in der die Atome durch ihre van-der-Waals Radien dargestellt sind, ergeben sich Bereiche, wo es möglich ist, durch das Protein hindurch zu sehen. Es ist jedoch nicht anzunehmen, dass diese Bereiche tatsächlich leer sind, sondern sie werden wahrscheinlich durch flexiblere Moleküle oder Molekülteile, wie Lipide, Carotinoide, oder die Phytylketten der Chlorophylle ausgefüllt. Zwei der insgesamt drei bis vier Carotinoide (Ruban et al., 1999) sind jedoch im Zentrum sichtbar: Mit ihrem Winkel von ca. 50° zur Membrannormalen sind sie noch stärker geneigt als die zentralen Helices. Sie stehen zueinander ebenfalls in einem überkreuztem Winkel, und schieben sich zwischen die Helices. Die beiden Carotinoide und die Helices A und B bilden so eine Anordnung zueinander, die an die verdrehten Stränge eines Seils erinnert. Die Chlorophylle wurden je nach ihrer Nähe zu den zentralen Carotinoiden nach Chl *a* oder Chl *b* zugeordnet. Der Unterschied zwischen Chl *a* und Chl *b*, ein Sauerstoff- und ein Wasserstoff-Atom, war bei der gegebenen Auflösung nicht zu erkennen. Auch eine Identifizierung möglicher Aminosäureseitenketten, die eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Formylgruppe des Chl *b* eingehen, konnte nicht durchgeführt werden, weil ein Großteil der kleinen Aminosäureseitenketten nicht aufgelöst ist. Die Zuordnung basiert auf der Tatsache, dass die Anregungsenergie der Chlorophyllmoleküle extrem schnell (Sub-Picosekunden) auf die Chl *a* Moleküle übertragen wird (Eads et al., 1989). Dort könnten möglicherweise Tripletanregungszustände entstehen, welche in der Anwesenheit von Sauerstoff die Bildung von aggressiven Singulett-Sauerstoff induzieren. Um diese Tripletzustände zu löschen, werden diese in weniger als 1 Nanosekunde auf nahe gelegene Carotinoide übertragen (Schödel et al., 1998), die diese strahlungslos in Wärme umwandeln. Die Zuordnung der Chlorophylle auf Grund dieser Überlegung lässt außer Betracht, dass sich noch mindestens ein weiteres Carotinoid im Komplex befindet. Jedoch lassen sich die Chlorophyllmoleküle tatsächlich in zwei Gruppen einteilen, die sich entweder im Abstand von ca. 4\AA oder im Abstand von ca. 8\AA zu den zentralen Carotinoiden befinden, wobei die letzteren dem Chl *b* zugeordnet wurden. Möglicherweise sind noch weitere Chlorophyllmoleküle im LHC-II vorhanden, die in der Struktur nicht aufgelöst wurden, da Analysen des Chlorophyllgehalts einen leicht höheren Wert als die momentan eingepassten 12 Chlorophylle ergaben (Kühlbrandt et al., 1994). Diese könnten peripher an das Polypeptid, oder aber auch an bereits vorhandene Chlorophyllmoleküle binden. Die jetzt aufgelösten Chlorophylle sind teilweise sehr stark zur Außenseite exponiert und auch an Trimerkontakten innerhalb des Komplexes beteiligt (vgl. Abschnitt 4.4.1). Um den Energietransfer im LHC-II zu verstehen, ist die

exakte räumliche Positionierung der einzelnen Chlorophylle wichtig. In der Struktur ist zu erkennen, dass die Chlorophylle in zwei Ebenen im Protein angeordnet sind, und dass die Ebenen der Porphyrinringe eher parallel zur Membrannormalen orientiert sind. Bei einigen peripheren Molekülen ist diese Orientierung bereits nicht mehr zweifelsfrei in der Elektronendichtekarte erkennbar. Für den Energietransfer zwischen einzelnen Pigmenten ist der Abstand sehr wichtig, mit Mittelpunktsabständen im Bereich von 9Å ist ein Energietransfer K_{ET} nach dem Förster-Mechanismus anzunehmen, welcher von der sechsten Potenz der Distanz abhängt (van Grondelle et al., 1994).

$$K_{ET} = \kappa^2 / \tau_D * (R_0 / R_{DA})^6$$

wobei $\kappa = \cos\alpha - 3\cos\beta_D \cdot \cos\beta_A$; τ_D ist die Fluoreszenzlebensdauer des Donors, R_0 der sogenannte Förster Radius (systemspezifische Konstante), R_{DA} der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorpigment, α der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten des Donors und Akzeptors, β_D und β_A der Winkel zwischen dem Verbindungsvektor Donor-Akzeptor und dem den Übergangsdipolmomenten von Donor oder Akzeptor.

Wie aus der Formel abzuleiten ist, spielt auch die Orientierung der Dipole der Chlorophyllmoleküle eine wichtige Rolle. Diese sind jedoch nicht in der Struktur erkennbar, da nicht ersichtlich ist, an welcher Stelle die Phytylketten mit dem Chlorinring verbunden sind. Da sich die Chlorophyllmoleküle an ihren Enden bis auf 4Å nahe kommen, ist besonders im Hinblick auf die Auflösung von 3.4Å in der Ebene und 4.9Å in Richtung der Membrannormalen auch ein direkter Energietransfer nach Dexter möglich, bei dem sich die Orbitale der beteiligten Moleküle berühren. Ein weiterer wichtiger Faktor stellt die Lage der Energieniveaus der einzelnen Pigmente dar, also deren Absorptionswellenlängen und die Frage, inwieweit diese excitonisch miteinander gekoppelt sind. Solche spektroskopischen Informationen sind nicht unmittelbar aus den Strukturdaten ableitbar. Es wurden jedoch schon Modellrechnungen für den Energietransfer im LHC-II durchgeführt, bei denen die Position der einzelnen Chlorophylle festgelegt war, aber die Lage der Absorptionsmaxima und die Ausrichtung der Dipole an zeitaufgelösten spektroskopischen Daten angepasst wurden (Trinkunas et al, 1997; Gradinaru et al, 1998). Diese Arbeiten stehen zueinander und zu den biochemischen Daten der vorliegenden Arbeit im Widerspruch. Mit der Bestimmung der Chlorophyllidentitäten und deren spektroskopischen Parametern wurde in der vorliegenden Arbeit ein wesentlicher Beitrag dazu geliefert, eine korrekte Modellierung des Energietransfers im LHC-II in Zukunft zu ermöglichen.

LHC-II spielt nicht nur in der Hinleitung von Anregungsenergie zu den Photosynthesezentren eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Verteilung der Energie zwischen den photosynthetischen Reaktionszentren I und II (Allen, 1992). Da bei starkem Licht das wasserspaltende PS-II offenbar effektiver arbeitet als das nachgeschaltete PS-I, kommt es zu einer Reduktion der Quinone, die die Elektronen zwischen den Reaktionszentren überträgt. Ein reduzierter Quinon-pool führt zur Aktivierung einer Thylakoid-Kinase, welche u.a. auch den LHC-II Komplex phosphoryliert (Allen et al., 1981; Zito et al., 1999). Diese Phosphorylierung bewirkt die Ablösung der peripheren LHC-II Komplexe und deren Ankopplung an das PS-I. Kürzlich wurde postuliert, dass auch eine lichtabhängige Konformationsänderung des LHC-II diesen Vorgang unterstützt (Zer et al., 1999). Eine Phosphorylierungsstelle liegt nahe des N-Terminus an einem Threonin oder Serin in der Position 3 bei Erbse (Michel et al., 1991). Es wurden jedoch auch Hinweise gefunden, dass weitere Phosphorylierungsstellen existieren (Dilly-Hartwig et al., 1998). Der N-Terminus, der auch für die Trimerisierung des LHC-II wichtig ist, konnte in der elektronenkristallographischen Struktur nicht aufgelöst werden. An den Positionen 17-22 wurde ein Motiv gefunden (WYGPDR), das für die Bindung des Lipids Phosphatidyl-Glycerin wichtig ist (Hobe et al., 1995). Dieses Lipid ist essentiell für die Trimerisierung des LHC-II. Es konnte gezeigt werden, dass Peptide, die dieses Motiv enthalten, ebenfalls an Phosphatidyl-Glycerin binden (Veverka et al., 2000). In der Struktur wäre es nun interessant zu sehen, an welcher Stelle dieses Lipid genau bindet, ob der N-Terminus eines Monomers auf ein benachbartes Monomer hinüberreicht, und ob sich die Lipidbindungsstelle beispielsweise an der Berührungsfläche zwischen zwei Monomeren oder im Zentrum des Trimers befindet. Die Polypeptidkette des LHC-II konnte jedoch nur von Aminosäure 26 bis 224 in die elektronenkristallographische Dichtekarte eingepasst werden. In biochemischen Untersuchungen war eine essentielle Rolle einzelner Aminosäuren am N- und C-Terminus für die Trimerisierung nachgewiesen worden. Von diesen war die Aminosäure W222 die einzige, die auch in der elektronenkristallographischen Struktur sichtbar war (Kutkatt et al., 1996). Sie etabliert einen hydrophoben Kontakt mit dem Isoleucin 124, das am stromalen Ende der Helix C des benachbarten Monomers lokalisiert ist (Standfuß, 2000). Der LHC-II Komplex ist als häufigster proteinöser Bestandteil der Thylakoidmembran wahrscheinlich bei der Bildung der Thylakoidstapel beteiligt (Miller & Lyon, 1985). Es wurde allerdings gezeigt, dass auch Thylakoide ohne LHC-II Stapel bilden können (Thornber & Highkin, 1974). Es wäre deshalb besonders interessant, die Schleifenregionen genau zu kennen, die aus der Membran herausragen. Bedingt durch die Methode der 2-dimensionalen Kristallisation, sind diese

Regionen jedoch nur schlecht aufgelöst, bzw. der Abschnitt zwischen Aminosäuren 101-115 konnte nicht zugeordnet werden. Man kann darüber spekulieren, ob die Kristallkontakte in einem 3-dimensionalen Kristall, der aus Stapel von 2-dimensionalen Kristallen gebildet wird, denen der Thylakoidstapel entspricht. Obwohl also bereits eine LHC-II Struktur mit fast atomarer Auflösung existiert, könnte eine Vielzahl von Fragestellungen durch eine höher aufgelöste Struktur besser beantwortet werden.

1.7 Faltung von LHC-II

Alle LHC Proteine sind in der Pflanze kernkodiert, d.h. sie müssen zuerst über die äußere und innere Chloroplastenmembran transloziert werden, bevor sie in die Thylakoidmembran inseriert werden, dort falten und Pigmente binden (Paulsen, 1995). Da die Polypeptide während des Transports keine Pigmente gebunden haben und entfaltet sind, würden sie zur starker Aggregation neigen und sind deshalb an Chaperone gebunden. Der Translokationsapparat, der die Proteine über die Chloroplastenmembranen transportiert, wird aus den Tic und Toc (transport inner/outer chloroplast membrane) Proteinen gebildet (Heins et al., 1998), der Translokationsprozess ist ATP und GTP abhängig. ATP wird hierbei für die Aktivität der Hitzeschockproteine/Chaperone benötigt, während GTP für die Aktivität des Transporters verwendet wird (Waegemann et al., 1990; Li et al., 1995). Um den Transport von Proteinen in das „richtige“ Zellkompartiment sicherzustellen, tragen sie Signalsequenzen. Diese werden dann am Zielort abgespalten, was bedeutet, dass die Proteine im Cytosol als längere Vorläuferproteine synthetisiert werden. Für den Import in Chloroplasten ist eine spezifische N-terminale Signalsequenz bekannt (Theg & Geske, 1992), die im Stroma durch die Protease SPP (stromal processing protease) entfernt wird. Für den Import in das Thylakoidlumen können die Polypeptide eine weitere Signalsequenz am N-Terminus tragen, welche von der TPP (thylakoid processing protease) abgespalten wird (Smeekens et al., 1990). Die Transportwege zur Thylakoidmembran zeigen Homologie zum bakteriellen Sekretionssystem, im Einklang mit der Hypothese des endosymbiontischen Ursprungs der Chloroplasten (Settles & Martienssen, 1998).

Die LHC-II Polypeptide werden als Vorläuferproteine nur mit der Stroma Signalsequenz synthetisiert, das Signal für die Insertion in die Thylakoidmembran ist intern auf dem LHC-Polypeptid lokalisiert und wird nicht entfernt. Dieses Signal bedingt die Bindung an die 54kDa Untereinheit des Chloroplasten Signal Recognition Particles (cpSRP) und damit den Import über den SRP Weg (vgl. Abb. 11). Die Integration des Polypeptids ist dann eng mit

der Bindung von Pigmenten verknüpft, welche für eine korrekte Faltung des LHC nötig ist (Hoover & Eggink, 1999).

Es sind vier verschiedene Importwege des Thylakoiden bekannt, in Abbildung 11 sind Beispiele von Proteinen gezeigt, die unterschiedliche Wege benutzen.

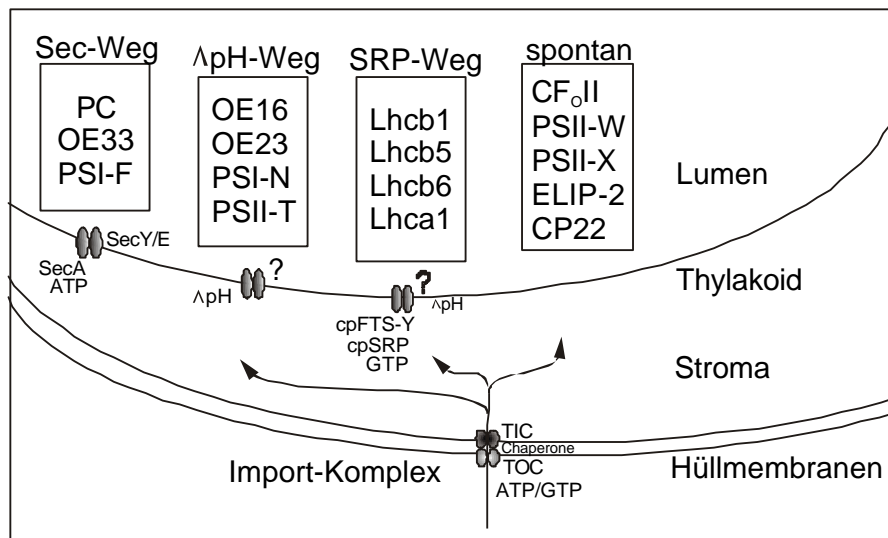


Abb. 11: Zielsteuerung von kernkodierten Proteinen über die Chloroplastenhüllmembranen in die Thylakoide

Der Sec Importkomplex, über den beispielsweise Plastocyanin importiert wird, zeigt Homologien zum bakteriellen System. Ein anderer Weg wird von den Polypeptiden OE16 und OE23 benutzt, die an der Bildung des Sauerstoff-entwickelnden Komplexes beteiligt sind; hier hängt der Import vom pH Gradienten an der Thylakoidmembran ab, der durch die Photosynthese erzeugt wird (Settles et al., 1997). Die Insertion der LHC Polypeptide ist vom signal recognition particle (SRP) abhängig, während z.B. die Untereinheit CF₀II der Chloroplasten ATPase spontan in die Membran inseriert. Es ist interessant, dass die LHC Homologen CP22 und ELIP (early light induced protein), einen anderen Insertionsweg beschreiten (Kim et al., 1999): diese unterscheiden sich nämlich in ihrer Pigmentbindung insofern deutlich von den anderen Mitgliedern der LHC Genfamilie, dass von den transient exprimierten ELIPs eine Pigmentbindung erst kürzlich überhaupt nachgewiesen werden konnte (Adamska et al., 1999), genauso wie CP22 ursprünglich als nicht pigmentierte Variante isoliert wurde (Ljungberg et al., 1986).

Beim Transport und Einbau von markiertem LHC-II Polypeptid in isolierte Chloroplasten konnte gezeigt werden, dass die Signalsequenz abgespalten wird, und das Polypeptid in Thylakoide eingebaut wird und Pigmente bindet (Schmidt et al., 1981); es wurde

nachgewiesen, dass auch bei der Insertion in isolierte Thylakoide pigmentierte Trimere gebildet werden (Kuttkat et al., 1995), jedoch war hierbei neben ATP immer ein Chloroplasten-Stroma-Extrakt für ein erfolgreiches Experiment nötig. Tu et al. (1999) gelang schließlich eine LHC-Insertion nur in der Anwesenheit von SRP, GTP und dem FtsY Protein, womit die Minimalanforderung der zur Thylakoidinsertion notwendigen Faktoren identifiziert ist. Über einen möglichen thylakoidständigen Rezeptor bzw. einen Insertionsapparat ist jedoch sehr wenig bekannt, kürzlich wurde eine Beteiligung des albino3 Proteins an der LHC Insertion immunologisch nachgewiesen (Moore et al., 2000).

Um diesen Vorgang zur makroskopischen Isolation von veränderten LHC-II Protein zu nutzen, wurden Tabakpflanzen mit LHC-II kodierenden Plasmiden transformiert (Flachmann & Kühlbrandt, 1996), und rekombinantes Protein über eine Histidin-Markierung isoliert. Punktmutierte LHC Proteine konnten jedoch trotz deutlich vorhandener mRNA Transkripte nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, da deren Synthese offenbar in der Pflanze unterdrückt wird oder sie abgebaut werden. Dies unterstützt die These, dass die Akkumulation von LHC-II einer posttranskriptionalen Kontrolle unterliegt (Flachmann & Kühlbrandt, 1995)

Ist man nur an der Herstellung von rekombinantem LHC interessiert, ohne die Beeinflussung durch die pflanzlichen Regulationsprozesse bei der LHC Biogenese, besteht die Möglichkeit der *in vitro* Faltung des LHC-II. Diese wurde erstmals von Plumley und Schmidt (1987) mit aus der Pflanze isolierten Komponenten, und von Paulsen et al. (1990) mit *E. coli* exprimiertem Polypeptid demonstriert. Hierbei wurde deutlich, dass Chlorophylle und Carotinoide eine wichtige strukturelle Rolle inne haben, da das Protein nur in Anwesenheit der Pigmente falten kann. Es wurde versucht, einzelne pigmentbindende Domänen durch N- und C-terminale Verkürzungen des Proteins zu identifizieren. Dieser Ansatz schlug jedoch fehl, es konnte bei allen Versuchen nur der komplette Erhalt oder Verlust der Faltungskompetenz der verkürzten Polypeptide beobachtet werden, was auf starke Kooperativität bei der Faltung oder Pigmentbindung schließen lässt (Paulsen & Hobe, 1992; Cammarata & Schmidt, 1992). In Kenntnis der Struktur ist dies nicht weiter verwunderlich, da fast alle Pigmentbindungsstellen im zentralen Transmembranbereich des LHC-II liegen. Eine Ausnahme bildet die Bindungsstelle für Chlorophyll *b3*, die C-terminal in der membranassoziierten Helix liegt und auch tatsächlich beeinflusst werden konnte (Cammarata & Schmidt, 1992). Komplexe mit verändertem Pigmentgehalt konnten erst durch Punktmutationen an aus der Struktur bekannten Bindungsstellen erzeugt werden (diese Arbeit, Rogl & Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999; Remelli et al., 1999).

Der *in vitro* Faltungsprozess der LHC-II Monomere wurde auch kinetisch untersucht, dabei wurden zwei Zeitkonstanten von ca. 50s und 400s gefunden (Booth & Paulsen, 1996). Es wurden außerdem Protokolle etabliert, um den LHC-II Komplex auch *in vitro* in seine native, trimere Form zu überführen (Hobe et al., 1994; diese Arbeit). Die minoren, monomeren LHC Komplexe CP24, CP26 und CP29 konnten ebenfalls mit ähnlichen Methoden wie LHC-II rückgefaltet werden (Pagano et al., 1998; Ros et al., 1998; Giuffra et al., 1996).

Es gibt mehrere Belege dafür, dass der *in vitro* rückgefaltete Komplex mit dem nativen identisch ist: a.) Rekombinante Komplexe binden die gleichen Pigmente wie native (Camarata & Schmidt, 1992), b.) rekombinante Komplexe bilden wie die nativen zweidimensionale Kristalle, deren Projektionskarte von nativen nicht zu unterscheiden war (Hobe et al., 1994), c.) beide Spezies zeigen gleiche optische Signale: am wichtigsten sind hierbei die charakteristische Rotverschiebung der Chlorophylle, die vor allem bei Tieftemperaturspektren gut aufgelöst werden kann, die starken Circular dichroismus-Signale, die nur für proteingebundene Pigmente typisch sind, und ein vollständiger Energietransfer von Chlorophyll *b* auf Chlorophyll *a*, wie er in einem Fluoreszenzspektrum deutlich wird (Peterman et al., 1996).

Obwohl der *in vitro* gefaltete Komplex nur aus einer einzigen Polypeptidspezies besteht und damit homogener als der nativ isolierte ist, zeigt sich ein Nachteil im Bezug auf die Spezifität der Pigmentbindung auf: diese ist stark von den *in vitro* verwendeten Ausgangspigmenten abhängig. So können beispielsweise Komplexe mit nur einer einzigen Carotinoidspezies gefaltet werden (Croce et al., 1999). Werden aber mehrere Carotinoidspezies angeboten, lassen sich die drei Bindungsstellen nach ihren Bindungspräferenzen deutlich differenzieren (Hobe et al., 2000). Bei der Chlorophyllbindung ist die Spezifität einzelner Bindungsstellen experimentell weitaus schwieriger nachzuweisen (Hobe, pers. Mitl.), da es 12 Bindungsstellen für Chlorophyll in dem Komplex gibt. Es ist im Extremfall möglich einen LHC-II Komplex rückzufalten, der fast nur (Kleima et al., 1999) oder nur (diese Arbeit) Chlorophyll *b* Moleküle bindet. Ein Komplex mit nativem Pigmentgehalt lässt sich deshalb nur unter genauer Kontrolle der Ausgangsbedingungen rückfalten.

1.8 Spektroskopie von Chlorophyllkomplexen

Bei der Absorption von elektromagnetischer Strahlung werden die Moleküle in einer Probe von niedrigeren zu höheren energetischen Zuständen angeregt. Abhängig von der Natur dieser Übergänge, korrespondiert die Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand mit einem gewissen Wellenlängenbereich: Ultraviolettes und sichtbares Licht bewirkt hierbei

die Anregung elektronischer Übergänge. Der Grundzustand unterscheidet sich vom angeregten Zustand dadurch, dass ein Elektron in ein anderes Orbital übergeht. Da die Geometrie der räumlichen Anordnung zweier Orbitale verschieden ist, geht mit dem elektronischen Übergang eine Änderung des Dipolmoments einher. Diese ist durch elektromagnetische Strahlung entsprechender Wellenlänge anregbar, und begründet somit die Absorptionseigenschaften eines Chromophors (Galla, 1988).

In einem Molekül gibt es neben den elektronischen Übergängen auch Schwingungsübergänge. Bei Raumtemperatur ist nur der Grundzustand besetzt, jedoch ist nach Anregung durch elektromagnetische Strahlung möglich, dass auch höhere Schwingungsniveaus besetzt werden (Ainsworth, 1976). Wird nun gleichzeitig der elektronische und ein Schwingungsübergang angeregt, führt das zu einer entsprechend höheren Energiedifferenz bzw. niedriger Wellenlänge der Absorption. Nimmt man z.B. die Absorptionsbande von Chl *a* bei 665nm und addiert hierzu einen Schwingungsübergang von 1100cm^{-1} , so ergibt sich eine Bande im Absorptionsspektrum bei 620nm, wie dies auch im Experiment beobachtet wird (Abb.11). Manche Autoren interpretieren diese Bande jedoch auch als elektronischen Q_x Übergangsdipolmoment des Chlorophylls (vgl. unten).

Auf Grund des konjugierten Doppelbindungssystems im Chlorophyll ist die Absorption, die den elektronischen Q_y Übergang anregt, weit ins Rote zu niedrigeren Energien verschoben. Ein experimentelles Absorptionsspektrum besteht jedoch nicht aus einer einzelnen Linie definierter Wellenlänge, sondern aus einer breiten Bande. Es lässt sich die sogenannte homogene und inhomogene Verbreiterung unterscheiden: Die homogene Breite wird durch die Breite der Absorptionslinie eines einzelnen Chromophormoleküls in der Probe bestimmt, die von der Lebensdauer und Kohärenz der elektronischen und der Schwingungsübergänge abhängt (Reddy et al., 1992); sie äußert sich in einer Verbreiterung zu einer Lorentzbande (Demtröder, 1977). Viele Chlorophylle im LHC-II besitzen nur eine extrem kurze Lebensdauer des angeregten Zustandes, da die Anregungsenergie sehr schnell auf benachbarte Chromophore übertragen wird. So wurde z.B. Energietransfer im LHC-II zwischen den Chlorophyllen von deutlich unter 1 ps gemessen (Eads et al., 1989, Conelly et al., 1997; Agarwal et al., 2000). Die inhomogene Verbreiterung gibt Anlass zu einer Gaußbande, welche eine statistische Verteilung der einzelnen Moleküle reflektiert. Da die Chlorophylle in die Proteinmatrix wie in ein Glas eingebettet sind, äußern sich kleine Veränderungen in dieser Matrix, z.B. verschiedene Konformationszustände, Proteinschwingungen etc. in der genauen Lage der Absorptionsmaxima der Pigmente. Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie ist es möglich, diese Unterschiede zu messen, welche sich auf eine langsamen Zeitskala beziehen

(Köhler, 2000), während sich mit Hilfe von hole burning Spektroskopie die homogene Breite der Absorptionslinien und die zugehörigen Protein-Schwingungsbanden bestimmen lassen (Reddy, 1992). Durch Addition dieser Einzelspektren kann dann das normalerweise beobachtete Gesamtspektrum der Probe in Lösung berechnet werden (May et al., 2000). Die elektronischen Übergänge im Chromophor sind außerdem auch direkt an die Schwingungszustände des Proteins (Phononen) gekoppelt (Peterman et al., 1997), so dass dies ebenfalls zu einer Verbreiterung der Absorptionsbanden führt.

Das sichtbare Chlorophyllspektrum kann durch Anwendung der Molekülorbitaltheorie auf das Porphyrinmolekül wie folgt erklärt werden (Weiss, 1978):

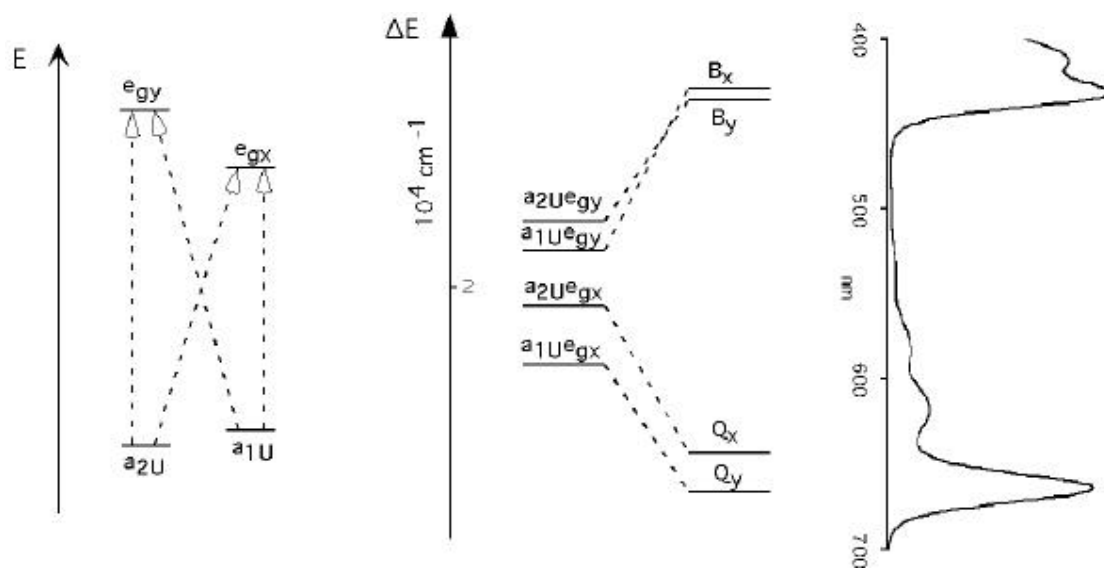


Abb. 12: Entstehung des Chlorophyllspektrums: links: Orbitalmodell des Chlorinrings und entsprechende Übergänge zwischen den höchsten gefüllten Orbitalen a und den untersten leeren Orbitalen e; Mitte: Übergänge im Chlorinring nach Linearkombination der Einzelkonfigurationen; rechts: korrespondierendes experimentelles Spektrum von Chlorophyll *a* mit Wellenlängenskala statt Energieskala; die Energieskalen sind verzerrt dargestellt, um die Korrespondenz der Energieniveaus mit den Banden im Spektrum (Nanometerskala) zu verdeutlichen.

Im Chlorinring sind anregbare Übergänge im p Elektronensystem zwischen den zwei höchsten gefüllten Orbitalen a_{1U} und a_{2U} zu den zwei niedrigsten leeren Orbitalen e_{gx} und e_{gy} möglich. Die beobachtbaren Spektral-“linien“ Q_y und B ergeben sich dann aus quantenmechanischer Linearkombination der jeweiligen einzelnen Konfigurationen. Im symmetrischen unsubstituierten Porphyrinring wären die Übergänge Q und B nicht nach x und y Richtung aufgespalten, die Q -Bande wäre außerdem symmetrieverboten. Im Spektrum von Häm ist der Q Übergang deshalb wesentlich schwächer als im Chlorinring, wo die Symmetrie vor allem durch die Reduktion eines Pyrrolringes gebrochen ist. Bei weiterer Reduzierung der Molekülsymmetrie, wie z.B. beim Bakteriochlorophyll, wird dann auch die

Q_x Bande beobachtet. Die B Übergänge werden auch als Soret-Bande bezeichnet. Weitere höherenergetische, ultraviolette Übergänge (L,M,N), an denen auch die nicht-bindenden Stickstoffelektronen beteiligt sein können, sind der Übersichtlichkeit halber hier weggelassen.

Im LHC-II Komplex interagieren nun 12 Chlorophyll Moleküle und die Carotinoide, um das beobachtbare LHC Spektrum zu bilden. Unter der Annahme, dass die Chlorophylle nur schwach untereinander interagieren, lässt sich das LHC-II Spektrum durch Addition der Spektren der einzelnen Chromophore erklären (Jennings et al., 1993). Der für LHC-II typische Nebengipfel bei 652nm im spektralen Bereich der Q_y Bande wird dem Chlorophyll *b* zugeordnet. Der Hauptgipfel bei 674nm wird von Chlorophyll *a* gebildet. Im Vergleich dazu absorbiert Chlorophyll *a* im apolarem Lösungsmittel Hexan bei 660nm, in polarem Methanol bei 665nm. Die deutliche Rotverschiebung im proteingebundenen Zustand kann durch spezifische Wechselwirkungen mit der Proteinmatrix erklärt werden, oder aber durch excitonische Wechselwirkungen zwischen eng benachbarten Chlorophyllmolekülen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der LHC-II Komplex eher durch die Superposition einzelner Chlorophyllbanden als durch ein gekoppeltes Ensemble aller Chlorophyllmoleküle beschrieben werden kann, wie das z.B. beim bakteriellen LH2 der Fall ist. Dort wird die Anregungsenergie eines einfallenden Lichtquants praktisch über den ganzen ringförmigen LH2 Komplex verteilt (Freer et al., 1996b; Köhler, 2000). Im Gegensatz dazu ist die Energie im LHC-II auf einzelne Chlorophylle lokalisiert (Nussberger et al., 1994), jedoch kann die excitonische Kopplung einzelner Chlorophyllpaare miteinander nicht ausgeschlossen werden (Leupold et al., 1999). Der Weg der Anregungsenergie sollte im Molekül entlang bestimmter Pfade verfolgt werden können. Mit Hilfe eines entsprechenden Modells könnte die primäre Funktion des LHC-II, die Lichtleitung, hervorragend beschrieben werden. Zur Erstellung einer entsprechenden Theorie ist ein Verständnis des Energieübertragungsmodus nötig, vor allem aber müssen die Parameter der genauen räumlichen Lokalisation der Chlorophylle, die Orientierung der Dipolmomente, die Unterscheidung der Bindungsstellen nach Chl *a* und Chl *b*, und die spektralen Charakteristika der einzelnen Chlorophyllmoleküle bekannt sein. Eine eventuelle excitonische Kopplung einzelner Chlorophylle ist in dieses Modell zu integrieren (van Grondelle et al., 1994). Auf Grund der vielen Parameter sind die publizierten Modelle, welche durch eine Anpassung an kinetisch aufgelöste Absorptionsdaten erstellt wurden, im Widerspruch zueinander und auch zu den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen (Trinkunas et al., 1997; Gradinaru et al., 1998). Der Wert dieser Arbeiten sollte jedoch nicht unterschätzt werden, da wahrscheinlich nur die zu große Anzahl der freien Fit-Parameter zu widersprüchlichen

Ergebnisse geführt hatte. Bei Kenntnis der richtigen Ausgangsparameter liegt in den spektroskopischen Modellen aber der Schlüssel zum Verständnis der Energieübertragung im LHC-II, welche die Hauptfunktion des Protein-Pigment Komplexes darstellt.

Bei einer Anregung eines kurzwellig absorbierenden Chl *b* Moleküls kann der Verlauf der Energie entlang eines energetischen Gradienten bis zum langwelligsten Chl *a* verfolgt werden (Connelly, 1997a), welches dann die Energie zum photosynthetischen Reaktionszentrum weitergibt, oder in einem Fluoreszenzexperiment isolierter LHC-II Komplexe emittiert. Bei kinetisch aufgelösten Absorptionsspektren wurden für den Chl *b* -> Chl *a* Transfer extrem kurze Transferzeiten im Bereich von 200 Femtosekunden gemessen (Connelly et al., 1997b), was auf hochspezifische Energieübertragungswege schließen lässt. Diese kinetischen Experimente waren auch Grundlage für die Zuordnung von Chl *a* und *b* in der Kristallstruktur (Kühlbrandt et al., 1994): Die Anregungsenergie wird in jedem Fall schnell auf die Chl *a* Moleküle übertragen. Falls sich nun dort Chl *a* Triplett Zustände bilden, können diese effektiv und schnell (Zeitkonstante 0.5ns) auf nahe gelegene Carotinoide weitergeleitet werden (Schödel et al., 1998). Carotinoide besitzen ihrerseits einen Pfad zur strahlungslosen Löschung angeregter Triplettzustände (Frank & Cogdell, 1996). Ein Triplettzustand in einem Molekül bedeutet die Besetzung zweier Orbitale mit Elektronen gleichen Spins. Chlorophylle werden nur selten in diesen Zustand angeregt, normalerweise wird der gepaarte Spin zweier Elektronen in einem Orbital auch bei der Anregung eines Elektrons in ein höheres Orbital beibehalten. Ändert sich der Spin des angeregten Elektrons jedoch, entsteht ein Triplett, welches mit zufällig anwesenden Sauerstoffmolekülen wechselwirken kann. Hierdurch wird aggressiver Singulett-Sauerstoff gebildet, welcher stark oxidierend auf Biomoleküle wirkt. In der Kristallstruktur wurden deshalb alle Chlorophylle als Chl *a* zugeordnet, die in der Nähe der zentralen Luteine liegen. Hierbei ist nicht berücksichtigt, dass im LHC-II Komplex noch mindestens ein weiteres Carotinoid vorhanden ist, welches in der Struktur nicht aufgelöst war. Ein weiterer Aspekt ist, dass nur die Chl *a* Moleküle geschützt werden müssen, auf denen die Anregungsenergie eventuell länger verweilt. Dafür kommen aus energetischen Gesichtspunkten vor allem die langwelligeren Chlorophyllspezies in Betracht.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die pigmentbindenden Eigenschaften des LHC-II zu untersuchen. Als wichtigste Frage galt die Zuordnung der einzelnen Chlorophylle als Chl *a* oder Chl *b*. Zu diesem Zweck sollte ein effektives Faltungssystem für LHC-II entwickelt werden, welches die *in vitro* Herstellung von mutierten LHC-II Komplexen erlaubte. Dieses basierte auf der Rückfaltung von Polyhistidin-markiertem Polypeptid aus *E. coli* exprimierten Einschlusskörpern auf einer Metallaffinitätssäule, und ist auch auf die Faltung anderer Membranproteine (und löslicher Proteine) übertragbar. Es erlaubte die Herstellung von LHC-II Punktmutanten, bei denen Aminosäurereste ausgetauscht wurden, deren Chlorophyll-bindende Eigenschaften aus der elektronenkristallographischen Struktur abgeleitet worden waren (Kühlbrandt et al., 1994). Durch die biochemische und spektroskopische Analyse der mutierten LHC-II Komplexe sollte die Spezifität der betroffenen Bindungsstellen untersucht werden. Eine Zuordnung des Chlorophylltyps und der zugehörigen Absorptionswellenlänge sollte vorgenommen werden. Es galt auch zu überprüfen, ob die einzelnen Bindungsstellen tatsächlich selektiv für Chl *a* oder Chl *b* sind, oder ob eine zufällige Besetzung erfolgt.

In dem entwickelten Rückfaltungssystem konnten nicht nur die LHC-II Polypeptide, sondern auch die eingesetzten Pigmente manipuliert werden: Durch die Verwendung von Chlorophyllderivaten sollte untersucht werden, welche chemischen Gruppen des Chromophors wichtig für die Bindung an den LHC Komplex sind.

Bei der Rückfaltung konnten die Ausgangspigmente so gewählt werden, dass Komplexe entstanden, bei denen einige Pigmentbindungsstellen fehlerhaft besetzt waren. Dadurch sollten Hinweise für die Funktion der einzelnen Chlorophylle und Carotinoide im LHC-II gewonnen werden. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit die in der Struktur sichtbaren zentralen Carotinoide tatsächlich als Lutein zugeordnet werden können, und welche Rolle die weiteren Carotinoide Neoxanthin und Violaxanthin spielen. Durch die biochemische Kopplung der Bindung von Chlorophyll und Neoxanthin konnte dabei auch die ungefähre Lage dieses Carotinoids aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation von nativem LHC-II

Nativer LHC-II aus Erbse wurde als Referenz zu dem rekombinant hergestelltem Komplex benutzt. Die Proben wurden über einen Saccharose-Dichtegradienten und KCl Fällung der rot fluoreszierenden Bande aufgereinigt (Burke et al., 1978 verändert nach Kühlbrandt et al., 1983) und freundlicherweise von Volker Brachvogel oder Matteo Lamborghini zur Verfügung gestellt.

2.2 Aufreinigung von Pigmenten

Für die Rückfaltung des LHC-II Komplexes wurden die Xantophylle Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin benötigt, sowie eine Chlorophyllfraktion mit definiertem Chlorophyll *a* zu Chlorophyll *b* Verhältnis. Bei allen Schritten war zu berücksichtigen, dass die Pigmente licht- und sauerstoffempfindlich sind, daher wurden Pigmentlösungen nach Möglichkeit dunkel, kühl, und unter Stickstoff oder Argon gehalten. Die Ausführung der einzelnen Arbeitsschritte unter Schutzgas war jedoch nicht nötig.

2.2.1 Totalextraktion von Pigmenten

Die Extraktion von Pigmenten erfolgte aus Spinatblättern mit einem Frischgewicht von ein bis zwei Kilogramm, die gewaschen, entstielt und übernacht (im dunkeln) bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Die Blätter wurden mit technischem Aceton in einem Mixer zerkleinert und durch vierlagigen Verbandsmull gefiltert und gepresst, dies geschah auf Grund der Menge der Blätter in mehreren Schritten. Der Blattrückstand wurde so lange mit Aceton gewaschen, bis dieser auf eine hellgrüne Farbe ausgebleicht war. Um Lösungsmittel zu sparen, wurde das Filtrat für die weitere Extraktion frischer Blätter wiederverwendet. Im letzten Schritt filtert man den Extrakt durch einen Faltenfilter (Schleicher&Schuell, 595¹/₂ 270mm), um restliche Partikel abzutrennen. Der Acetonextrakt wurde dann mit Hilfe eines Rotationsverdampfers mit Trockeneis-Kühlfinger eingedampft, wobei 40°C nicht überschritten wurden. Das beim Eindampfen am Rundkolben angelagerte Chlorophyll konnte dort verbleiben, der wässrige Rückstand wurde mit NaCl bis über die Sättigungsgrenze hinweg versetzt und mit technischem Diethylether ausgeschüttelt. Die Diethyletherphase wurde im vorher benutzten Kolben mit dem darin befindlichen Chlorophyll erneut bei 25°C

eingedampft. Vorsicht, beim Eindampfen von Ether besteht bei Erwärmen Explosionsgefahr ! Der wässrige Rückstand wurde erneut mit Hilfe von NaCl und Diethylether (p.a.) ausgeschüttelt und einrotiert. Ein Restwasseranteil im Bereich weniger ml war tolerierbar (vgl. nächster Abschnitt).

2.2.2 *Chlorophyllfällung*

Die Pigmente wurden in 100 ml Aceton unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades gelöst und nach Zugabe von 10 ml Wasser und 10 ml Dioxan 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Inkubation von zwei Stunden bei -20°C konnte das ausgefallene Chlorophyll durch einen Faltenfilter abgetrennt werden. Aus dem Durchfluss wurden anschließend die Carotinoide isoliert. Das am Filter zurückgehaltene Chlorophyll wurde in Diethylether aufgenommen und anschließend vorsichtig mit etwas Wasser ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde wie zuvor einrotiert, Restwasser durch erneutes Ausschütteln mit Ether (p.a.) und NaCl entfernt. Die Ausbeute an Chlorophyll betrug mindestens 100 mg, das Chl *a/b* Verhältnis wies einen Wert von 3 auf; es ist zu beachten, dass das so gereinigte Chlorophyll noch Restcarotinoide enthält. Die trockenen Pigmente sind bei Aufbewahrung unter Argon und bei -20°C für mindestens ein Jahr stabil.

2.2.3 *Carotinoidreinigung*

Der Durchfluss aus der Chlorophyllfällung wurde zu einem minimalen Volumen einrotiert, anschließend mit 100 ml Ethanol und 10 ml 60% KOH Lauge versetzt, und übernacht unter Schutzgas bei 4°C inkubiert. Diese Lösung wurde erneut zu einem minimalen Volumen einrotiert, und vorsichtig mit Diethylether ausgeschüttelt. Die verbleibende wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert, bis keine Carotinoide mehr in die organische Phase übergangen. Die kombinierten organischen Phasen wurden dann mehrmals mit Wasser gewaschen, bis diese eine klare gelbe Farbe angenommen hatten. Die organische Phase wurde nun im Rotationsverdampfer eingeengt, Restwasser durch NaCl Zusatz und erneutes Ausschütteln mit Diethylether (p.a.) entfernt. Der Carotinoidextrakt kann trocken oder als acetonische Lösung unter Schutzgas bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.4 *Trennung von Chlorophyll a und Chlorophyll b*

Eine Trennung von Chl *a* und Chl *b* war nötig, um ein definiertes Chl *a/b* Verhältnis im LHC-II Rückfaltungsversuch einstellen zu können, und in einigen Versuchen restliche Carotinoide aus der Chlorophyllpräparation abzutrennen. Hierzu gibt es prinzipiell verschiedene Möglichkeiten:

1. Dünnschichtchromatographie, siehe Kapitel 2.2.5.
2. Normalphasensäulenchromatographie mit Puderzucker als Festphase und Petrolether als mobile Phase (Strain et al., 1963). Die hervorragenden Trenneigenschaften dieses Systems werden durch die schlechten Packungseigenschaften des Zuckers stark vermindert.
3. Normalphasensäulenchromatographie mit DEAE-Cellulose als Festphase und Hexan als mobile Phase (Omata & Murata, 1980).
4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie in der Umkehrphase. Da dieses System die besten Trenneigenschaften und die höchste Kapazität zeigte, wurde es standardmäßig verwendet (Hobe, 1995a). Es kam entweder eine Säule vom Typ μ -Bondapak C 18 (19 x 300 mm) der Firma Waters mit 82% wässrigem Aceton als Laufmittel zum Einsatz, oder eine Säule vom Typ Gromsil ODS-4 HE (20 x 300mm) der Firma Grom mit 87% Aceton als Laufmittel. Der Wasseranteil wurde mit 10 mM Tricine/Tris Puffer auf pH 7 eingestellt. Die Flussrate an der HPLC Anlage Waters 600S/626 betrug 5 ml/min, die Säulen wurden nach jedem Lauf mit 100% Aceton gespült und in 50% wässrigem Methanol aufbewahrt, mit der Acetonspülung wurde in der Regel bereits nach der Chl *b* Elution begonnen. Zur Probenvorbereitung wurde der Chlorophyllextrakt in 5 ml Aceton mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst, nicht gelöste Bestandteile anschließend bei 10 000 U/min in einem Sorvall SS-34 Rotor in Durex Glaszentrifugenröhrchen abzentrifugiert, und der Überstand vor dem Probenauftrag filtriert (Anotop 10; 0.1 μ m Filter, Whatman). Der maximale Probenauftrag betrug 100 mg bei der Waters-Säule und 80 mg bei der Gromsil-Säule; bei diesen Mengen wurde nur eine Chl *b* Anreicherung erzielt, das Probenauftragsvolumen betrug dabei ca. 15ml. Eine Basislinientrennung von Chl *a* und Chl *b* wurde bei jeweils 50 und 35 mg für beide Säulentypen erreicht. Trotz der geringeren Kapazität der Gromsil-Säule wies diese eine höhere Langzeitstabilität auf. Die eluierte grüne Chl *b* Fraktion und blaue Chl *a* Fraktion wurden wie unter 2.2.1 einrotiert und aufbewahrt.

2.2.5 Trennung der Carotinoide

Lutein und Violaxanthin wurden durch Trennung auf der präparativen Gromsil ODS-4 Säule gereinigt (vgl. 2.2.4), als Laufmittel diente 78% Aceton, es wurde 12 mg Carotinoidmischung aufgetragen. Da keine optimale Trennung stattfand, wurden die mit Violaxanthin angereicherten Fraktionen aus dem ersten Lauf (75% Reinheit) rechromatographiert, so dass im zweiten Lauf eine Reinheit von 99.5% erzielt wurde. Die Reinheitsgrade wurden durch einen analytischen HPLC Lauf bestimmt (siehe Kapitel 2.11.2).

Neoxanthin wurde mittels Dünnschichtchromatographie gereinigt. Ein analytischer Dünnschichtlauf zur Pigmenttrennung wurde mit einer Polygram Kieselgel 60 Platte (40x80x0.25mm) der Firma Roth durchgeführt, als Laufmittel diente Methanol : Aceton : Wasser = 4 : 0.8 : 0.6.

Für präparative Zwecke wurden 2mg Carotinoidmischung auf 2 Dünnschichtplatten Kieselgel 60 auf Plastik, 200x200x0.2mm der Firma Merck aufgetragen. Die Platten wurden mit Benzin (30-50) : Dioxan : 2-Proanol = 35 : 15 : 5 entwickelt, die entsprechende Bande ausgekratzt und in Aceton gelöst, die Ausbeute betrug 0.5 mg Neoxanthin der Reinheit 96%.

Lutein und Zeaxanthin sind kommerziell bei der Firma Roth zu erwerben, die durch HPLC bestimmten Reinheitsgrade betrugen jeweils 99% und 95%.

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 *Genetisches Ausgangsmaterial*

Zur Herstellung von LHC-Protein ohne C-terminale Histidin-Markierung wurde der Klon D7.f3 von Harald Paulsen, Institut für Allgemeine Botanik der Universität Mainz, verwendet (Dilly-Hartwig et al., 1998). Ebenso aus Mainz stammte der Klon C3.2h, der für matures LHC-II Protein codiert, jedoch am C-terminus eine hexa-Histidin-Markierung trägt (Rogl et al., 1998). Die jeweiligen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt. Alle Klone enthalten das lhcb1*2 Gen aus Erbse, das ursprünglich von Cashmore, 1984 unter dem Namen cab AB80 publiziert wurde (EMBL Datenbank Name PSCAB80). Dieses Gen codiert nach der Prozessierung im Chloroplasten für ein 232 Aminosäure langes Polypeptid, das *E.coli* exprimierte Protein hat jedoch die Länge von 233 Aminosäuren, da der N-Terminus um ein Methionin verlängert ist.

2.3.2 *Herstellung von Punktmutanten*

Punktmutationen wurden an den aus der Struktur bekannten Chlorophyll bindenden Aminosäureresten eingeführt, in der Regel wurde die vorhandene Seitenkette „entfernt“ und die betreffende Aminosäure durch Alanin ersetzt. Um die gewünschte Mutation einzuführen wurde eine PCR mit mutagenen Primern an einer denaturierten, doppelsträngigen Matrize, nämlich dem gesamten Ausgangsplasmid, mit dem Pfu Polymeraseenzym durchgeführt. Der Erfolg der PCR wurde auf einem 1% Agarosegel verifiziert. Der PCR Reaktionsansatz wurde anschließend mit Dpn I Restriktionsenzym verdaut, so dass die methylierte Ausgangsmatrize verdaut wurde, jedoch nicht das *in vitro* erzeugte, unmethylierte PCR Produkt (Weiner et al.,

1994). Hierzu wurde der „Quick-Change Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Das PCR Produkt wurde in *E.coli* Epicurian XL-Blue Stämme (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers transformiert. Da in über 90% Prozent der Fälle die Mutation erfolgreich auf genetischer Ebene eingeführt wurde, wurden mutierte Klone zuerst auf Proteinexpression getestet: Einige Klone zeigten hierbei keine Proteinexpression. Eine Retransformation ihres Plasmids in andere Expressionsstämme (JM101, Paulsen et al., 1991 oder C41/C43 Miroux & Walker, 1996) änderte nichts an dem Expressionsmuster. Von exprimierenden Klonen wurde Plasmid DNA mittels des Quiagen „Miniprep Kits“ isoliert, und jene sequenziert. Die Sequenzierung wurde von der Firma Seqlab durchgeführt, als Primer wurde das Oligonukleotid `cac att gaa ttg gga aga aga tta c` (Name „LHChisrev“) benutzt. Dieser bindet an den antiparallelen Strang des Plasmids, so dass eine Sequenzierung des Inserts „von hinten“ (von 3′, nähme man den codierenden DNA Strang als Referenz) erfolgte. Dies hat den Vorteil, dass man Daten von höherer Qualität erhält, die Mutationen näher am C-Terminus des LHC Polypeptids betreffen; die chlorophyllbindenden Aminosäuren sind eher C-terminal gelegen. Mit einer Leseweite von 700 Basenpaaren wurde von jeder Mutante immer das komplette *lhc* Gen sequenziert. In der folgenden Tabelle sind die ausgetauschten Aminosäuren mit den jeweils gebundenen Chlorophyllen (Nomenklatur nach Kühlbrandt et al., 1994) und die verwendeten Mutageneseprimer dargestellt:

Klon	Chl	Oligonukleotidsequenz	Namens- kürzel
Q131A	<i>b6</i>	<code>gcc ata tgg gcc act gca gtt atc ttg atg gg ccc atc aag ata act gca gtg gcc cat atg gc</code>	HR1 HR2
N183A	<i>a2</i>	<code>ggt gaa gga act caa ggc agg tag att agc c ggc taa tct acc tgc ctt gag ttc ctt cac c</code>	HR3 HR4
E65A	<i>a4</i>	<code>ccg tga gct agc agt cat cca ctc cag ctg gag tgg atg act gct agc tca cgg</code>	HR9 HR10
E65L	<i>a4</i>	<code>ccg tga gct tat agt cat cca ctc cag atg gg ccc atc tgg agt gga tga cta taa gct cac gg</code>	JS1 JS2
H68A	<i>a5</i>	<code>ccg tga gct tga agt cat cgc atc cag atg ggc gcc cat ctg gat gcg atg act tca agc tca cgg</code>	HR11 HR12
H68L	<i>a5</i>	<code>ccg tga gct tga agt cat cat ctc cag atg ggc gcc cat ctg gag atg atg act tca agc tca cgg</code>	JS3 JS4
LG77/78VF	<i>a6</i>	<code>ggg cta tgt tgg gtg ctg tct tct gtg tct tcc cag agc gct ctg gga aga cac aga aga cag cac cca aca tag ccc</code>	HR13 HR14
G78I	<i>a6</i>	<code>ggg cta tgt tgg gtg ctt tga tat gtg tct tcc c ggg aag aca cat atc aaa gca ccc aac ata gcc c</code>	JS5 JS6

E139A	<i>b5</i>	ctt gat ggg agc tgt cgc agg tta ccg tat tgc c ggc aat acg gta acc tgc gac agc tcc cat caa g	HR15 HR16
E180A	<i>a1</i>	gaa ttg aag gtg aag gcc ctc aag aac ggt ag cta ccg ttc ttg agg gcc ttc acc ttc aat tc	HR17 HR18
Q197A	<i>a3</i>	gtt tgg att ctt cgt ggc cgc tat tgt aac tgg aaa g ctt tcc agt tac aat agc ggc cac gaa gaa tcc aaa c	HR19 HR20
Q197L	<i>a3</i>	gga ttc ttc gtt cta gct att gta act gg cca gtt aca ata gct aga acg aag aat cc	HR25 HR26
H212A	<i>b3</i>	gga gaa cct tgc tga agc gct tgc aga ccc agt caa c gtt gac tgg gtc tgc aag cgc ttc agc aag gtt ctc c	HR21 HR22

Tabelle 2: Mutageneseprimer für die Chlorophyllbindungsstellen im LHC-II.

2.4 Proteinexpression

2.4.1 Anzucht der Bakterien

In einem 2l Erlenmeyer-Schikane-kolben wurden 1l LB Medium (60µg/ml Ampicillin) mit 30ml Vorkultur angeimpft. Die Anzucht erfolgte bei 37°C in einem Schüttler bei 250 U/min. Bei einer OD_{600nm} von 0.8 wurde mit 1mM IPTG induziert. Die Zellen konnten nach 4h geerntet werden

2.4.2 Reinigung von Einschußkörpern

Das Zellpellet von einem Liter Bakterienkultur wurde in 50mM Tris-Cl pH 7.5 aufgenommen und erneut abzentrifugiert, alle Schritte wurden in der Kälte durchgeführt. Anschließend wurde es in diesem Puffer für den Zellaufschluss mit einer Tablette *Complete* Protease Inhibitor (Boehringer Mannheim) und einer Spatelspitze DTT suspendiert und 3 min im Ultraschallbad behandelt. Der Aufschluss wurde entweder mit einer *French Pressure Cell* (Amicon) oder einem Zellhomogenisator *Microfluidizer* (Microfluidics Corporation) durchgeführt, die Anfangsvolumina betrugen jeweils 25 oder 100ml. Um einen vollständigen Aufschluss zu erreichen, wurden zwei Durchläufe im Aufschlussgerät benötigt. Das Homogenisat wurde in einem Sorvall SS-34 Rotor 10min bei 20 000 U/min zentrifugiert, das Pellet mit Hilfe eines Borstenpinsels in DETERGENZ Puffer suspendiert. Dieser Vorgang wurde mit TRITON Puffer und 20mM Tris-Cl pH 7.5 wiederholt, das Pellet dann in 5ml 20mM Tris-Cl pH 7.5 aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde in A280 Puffer bestimmt, die verdünnte Probe wurde dazu für 5min auf 95°C erhitzt. Eine Absorption von 1 (Lichtpfad 1cm) entspricht dabei einer Konzentration von 0.525g/l LHC-II Apoprotein (Hobe, 1995a).

DETERGENZ Puffer: 50mM Tris, 200mM NaCl, 2mM EDTA, 5 mM DTT, 1% Desoxycholat, 1%IGEPAL C630 (alter Name Nonidet P40), pH 7.5

TRITON Puffer: 20mM Tris, 1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 7.5

A 280 BUFFER: 10mM Tris, 2% SDS, 1mM Mercapto-Ethanol, pH 6.8

2.5 *In vitro* Faltung von LHC-II

LHC-II wurde aus *E.coli* exprimiertem Apoprotein und mit gereinigten Pigmenten rückgefaltet, die aus Spinat isoliert worden waren.

2.5.1 *Faltung von LHC-II Trimeren durch Detergenzpräzipitation*

Das Protokoll von Hobe et al. (1994) wurde modifiziert und vereinfacht. Der Minimalansatz von 2 ml wird im folgenden beschrieben: 1 mg LHC Apoprotein wurde in 1.8 ml Rekonstitutionspuffer (0.1M Tris, pH 9.0, 12.5% Saccharose, 2% Li-dodecylsulfat) für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach Abkühlung auf 0°C wurde DTT zu 5mM und 0.4mg Phosphatidylglycerol gelöst in 0.2 ml Rekonstitutionspuffer zugegeben. Bei Kombination mit dem Säulenfaltungsprotokoll (Kapitel 2.5.2) wurde DTT weggelassen, da dieses das Ni^{2+} im Säulenmaterial reduziert; es kann durch β -Mercaptoethanol ersetzt werden. Die Pigmente (1 mg Chl, a/b=1.4, 0.3mg Carotinoide) in 0.2ml Ethanol wurden schnell mit der Lösung vermischt. Nach 20 min wurde nacheinander 0.2 ml Octylglucosid (10%) und 0.3 ml KCl (3M) zugegeben, anschließend 5 min abzentrifugiert. Das Detergenz präzipitierte als weißes Pellet, auf welchem eine grüne Schicht ungelöster Chlorophylle aufgelagert war. Der Überstand wurde mit einem gleichen Volumenteil Dialysepuffer versetzt und übernacht gegen 5l 10mM Tris-Cl pH 7.5 dialysiert, die Ausschlussgrenze der Dialysemembran betrug 12 kDa. Die dialysierte Probe wurde am folgenden Tag mit 100 ml Dialysepuffer versetzt und in einer Amicon Druckzelle mit einer Membran mit Ausschlussgrenze 10 kDa auf ein minimales Volumen eingeengt. Das präzipitierte Material wurde mit 0.2% Dodecylmaltosid solubilisiert und abzentrifugiert, das Pellet kann erneut solubilisiert werden. Die in der Fraktion enthaltenen Trimere können durch Zentrifugation auf einem Saccharose-Dichtegradienten weiter gereinigt werden

2.5.2 *Faltung von LHC-II Trimeren mittels Ni-Säule*

Es wurden Säulen von 1ml Volumen mit Pharmacia Chelating Sepharose FF gegossen. Diese wurden vor jeder Verwendung mit 1ml 0.3M NiCl_2 beladen und mit 3ml 50mM Tris-Cl pH

7.5 äquilibriert. Die Säulen wurden nach dem Versuch durch Waschen mit 5% SDS, 0.5M Imidazol pH 7.5 regeneriert.

1mg gereinigtes Apoprotein wurde 10 min bei Raumtemperatur in 1.8ml Harnstoff mit 20mM Tris-Cl pH 7.5 inkubiert, 1 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen mit 2 mal 1ml LDS Puffer wurde die Säule in den Kühlraum (6°C) transferiert und weiter mit 1ml kaltem OG1 Puffer gewaschen. Nun wurde die Pigmentmischung (0.5mg Chl, $a/b = 1.4$, 0.075mg Carotinoide), die in 40 µl Ethanol gelöst war, mit 0.36ml OG1 Puffer gemischt und auf die Säule aufgetragen. Nach 30min Inkubation im dunkeln wurde mit 0.5ml OG2 Puffer und 1ml TX Puffer gewaschen. Die Elution des gefalteten Proteins als grüne Fraktion begann typischerweise nach 0.6 ml ELU Puffer.

Pufferzusammensetzungen:

- LDS: 2% Li-dodecylsulfat, 0.1M Tris-Cl pH 9.0, 0.1M NaCl, 20 mM Imidazol
- OG1: 1% Octylglucosid, 0.1M Tris-Cl pH 9.0, 12.5% Saccharose
- OG2: 1% Octylglucosid, 0.1M Tris-Cl pH 7.5
- TX: 0.05% Triton X-100, 0.1g/l synthetisches Phosphatidylglycerol, (Dipalmitoyl~), (Sigma), 0.1M Tris-Cl pH 7.5
- ELU: 0.05 % Triton X-100, 0.1g/l synthetisches Phosphatidylglycerol, (Dipalmitoyl~), (Sigma), 0.3M Imidazol pH 7.5

Die Lipid-haltigen Puffer wurden mit einem Ultraschallkopf 5 min beschallt, um das Lipid in Lösung zu bringen.

2.6 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Saccharosegradienten wurden mit einem Gradientenmischer (Gradient Master, Firma Biocomp) hergestellt, hierbei wurden zwei Lösungen unterschiedlichen Zuckergehalts im Zentrifugenröhrchen kontrolliert vermischt. Als Puffer diente 10 mM Tris-Cl pH 7.5 und 0.1% Dodecylmaltosid. Bei Verwendung von 0.06% Detergenz erhält man ein störungsfreieres Fluoreszenzspektrum der LHC-II Trimer Banden. Für 12ml Gradienten (Beckman SW-40 Rotor) wurde 5% und 35% Saccharose verwendet, für 23ml Gradienten (Beckman Ti-70 Festwinkel-Rotor) 10% und 45%; da es für die Festwinkelröhrchen keinen Spezialverschluss zur Gradientenformung gibt, wurden sie vollständig gefüllt, mit dem Zentrifugationsdeckel verschlossen und danach von oben 3ml abgenommen, um Raum für die

Probe zu gewinnen. Alternativ konnten Gradienten in den SW-40 Röhrchen mit einer 20.5%igen Saccharoselösung hergestellt werden, dies geschah durch dreimaliges Einfrieren und langsames Auftauen bei 6°C.

Die Zentrifugation erfolgte im SW-40 Rotor bei 40 000 U/min für 20h bei 4°C oder im Ti-70 Rotor bei 60 000 U/min für 14h bei 4°C.

2.7 Nativgelelektrophorese mit Pigmentextraktion

Nativgele für die Auftrennung von LHC-II Monomeren und Trimeren wurde in einer Biorad Mini Protean II Apparatur durchgeführt, die für das Gel die Dimensionen 60 x 80 x 1mm aufwies. Das Trenngel enthielt 0.3 M Tris-Cl pH 9.0, 9% Glycerin und 15% Acrylamid (aus Stammlösung 40% mit 2.6% *Crosslinker*, Biorad) und wurde durch 0.03% Ammoniumpersulfat und 0.1% TEMED polymerisiert. Das Sammelgel enthielt 0.1M Tris-Cl pH 7.0, 4% Acrylamid, 0.03% Ammoniumpersulfat und 0.2% TEMED. Die Geltaschen fassten 50µl, die Proben wurden vor dem Auftrag mit 10% Glycerin beschwert. Als Laufpuffer diente 0.3% Tris-Base, 1.44% Glycin, 0.1% SDS, die Elektrophorese wurde bei 20mA pro Gel bei 6°C durchgeführt. Die native Struktur des Proteins, sichtbar als grüne Bande, bleibt in diesem System nur bei kurzen Laufstrecken erhalten (ca. 2cm).

Die Banden aus dem Gel wurden auf ihren Pigmentgehalt hin untersucht: Grüne Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels einer Plastikspritze durch ein Metallnetz gedrückt, das an die Spritze angeschmolzen war. Die Gelstückchen wurden in 5% SDS und 0.1 M Tris-Cl pH 7.5 5min geschüttelt, für die Analyse auf der HPLC wurde dann Aceton zu 67% zugegeben.

2.8 Denaturierende SDS-Gelelektrophorese

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli, 1970 durchgeführt. Hierzu wurde das Protokoll unter 2.7 verwendet, die Pufferkonzentration betrug jedoch im Trenngel 0.5M, das Gel enthielt 0.1% SDS. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf 2% SDS, 10% Glycerin, 50mM Tris-Cl pH 6.8, 5% β -Mercaptoethanol und 0.05% Bromphenolblau eingestellt. Der Lauf wurde bei 40mA durchgeführt.

2.9 Western Blot

Ein Western Blot wurde auf einer Immobilon-P Membran der Firma Waters/Millipore nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde der polyklonale LHC-II Antikörper

#110 aus Kaninchen verwendet, der am EMBL Heidelberg hergestellt worden war (Nußberger, 1994). Als sekundärer Antikörper diente ein Anti-Kaninchen IgG der Firma Sigma, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war. Die Entwicklung des Blots wurde mit Fast Red TR/Naphthol AS-MX der Firma Sigma nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.10 Agarosegelelektrophorese

Es wurden 1% Agarosegele der Größe 6 x 6 x 1cm gegossen. Als Lauf- und Gelpuffer diente 0.5 x TBE Puffer (0.54% Tris-Base, 0.275% Borsäure, 2mM EDTA) mit $5 \times 10^{-5}\%$ Ethidiumbromid. Der Lauf wurde bei 50mA durchgeführt.

2.11 Pigmentanalyse

2.11.1 Photometrische Pigmentanalyse

Chlorophyllkonzentrationen wurden photometrisch in 80% Aceton bestimmt (Porra et al., 1989). Die Absorption einer vorher zentrifugierten Probe wurde bei den Wellenlängen 646.8nm und 663.6nm gemessen, die Absorption der Probe bei 750nm wurde als Referenz subtrahiert. Folgende Gleichungen wurden verwendet:

$$\text{Chl a } [\mu\text{g/ml}] = 12.25 A^{663.6} - 2.55 A^{646.6}$$

$$\text{Chl b } [\mu\text{g/ml}] = 20.31 A^{646.6} - 4.91 A^{663.6}$$

Die Konzentration an Carotinoiden konnte nach Lichtenthaler, 1987, abgeschätzt werden:

$$\text{Car } [\mu\text{g/ml}] = (1000 A^{470} - 1.82 [\text{Chl a}] - 85.02 [\text{Chl b}]) / 198$$

Für gereinigte Carotinoide wurde ein Extinktionskoeffizient von $E^{1\%}_{1\text{cm}} = 2500$ verwendet (Lichtenthaler, 1987).

Für Chlorophyllderivate wurden Extinktionskoeffizienten der Q_y Bande aus dem Labor von Hugo Scheer, Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt. Die Extinktionskoeffizienten in 80% Aceton wurden durch eindampfen der Probe und Aufnahme im neuen Lösungsmittel bestimmt:

Zn-Phäophytin *a* : $77.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in 80% Aceton (Labor Scheer).

3-Acetyl-Chlorophyll *a* : $76.1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in 100% Aceton (Labor Scheer) => $73.7\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in 80% Aceton.

3-Vinyl-Bakteriochlorophyll *a* : $82.5\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in Diethylether (Labor Scheer) => $49.1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in 80% Aceton.

2.11.2 Pigmentanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Durch HPLC konnten in einem Lauf Chlorophylle zusammen mit Carotinoiden mit hoher Sensitivität bestimmt werden. Die im folgende beschriebene Methode ist verändert nach Gilmore & Yamamoto, 1991: Es wurde eine Spherisorb ODS-1 5U Säule (Alltech) der Dimension 250 x 4.6mm verwendet. Als Laufmittel A diene Acetonitril : Methanol : 0.1M Tris-Cl pH 8.0 = 720 : 80 : 30, als Laufmittel B Hexan : Methanol = 4 : 1. Das Programm lautete bei 2 ml/min Flussrate: 0min: 0% B, 2min: 50% B, 6min: 75% B, 7min: 100% B, 9min: 100% B, 10min: 0% B, das Injektionsvolumen betrug 50 µl. Die Proben wurden in 80% kalten Aceton extrahiert und 3min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Da sich Chlorophylle in Aceton mit der Zeit in die Chl' Epimere umwandeln, ist eine unmittelbare Analyse essentiell.

Die Detektion erfolgte mit einem Waters 996 Photioden Array bei 440nm. Für Chlorophyll *a* und *b* wurde eine Eichkurve mit photometrisch bestimmten LHC-II Extrakten erstellt, da es sich hierbei um die am besten konservierten Chlorophylle handelt (Epimer-frei). Für die Carotinoide wurde eine Eichkurve mit gereinigtem Lutein erstellt. Da der Extinktionskoeffizient aller Carotinoide mit $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ bei 2500 im Absorptionsmaximum angenommen wurde (Lichtenthaler, 1987), konnten die entsprechenden Werte für Violaxanthin und Neoxanthin bei 440nm durch die Spektren berechnet werden, die am Dioden Array erstellt worden waren.

Diese HPLC Methode ermöglichte keine zufriedenstellende Trennung zwischen Chlorophyll *b* und 3-Acetylchlorophyll *a* bzw. Chlorophyll *a* und 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll *a*. Diese konnten mit Hilfe eines isokratischen Laufes von 15 min bei 1.5ml/min auf der oben beschriebenen ODS-1 Säule getrennt werden, als Laufmittel diene 83% Aceton mit 2mM Tricine/Tris pH 7.0 im Wasseranteil.

2.12 Spektroskopische Analysen

2.12.1 Absorptionsspektroskopie

Absorptionsspektren bei Raumtemperatur wurden an einem Lambda Bio 40 Spektrometer der Firma Perkin Elmer aufgenommen (spektrale Bandbreite 2nm, 1cm Küvetten),

Absorptionsspektren bei 4K wurden im Arbeitskreis Molekulare Spektroskopie am Institut für Physik der Humboldt Universität zu Berlin aufgenommen. Rekombinante Trimerproben aus dem Saccharosedichtegradienten wurden hierzu in einem Centrikon 30 Membranfilter ca.

70fach aufkonzentriert und mit 67% Glycerin versehen. In 1mm Glasküvetten wurden sie in einem Oxford Kryostaten, der mit einer Heizung ausgestattet war, langsam auf die Temperatur des flüssigen Heliums abgekühlt. Um die Bildung von Rissen beim Einfrieren zu minimieren, wurde zwischen 120 und 150K besonders langsam gekühlt. Die Spektren wurden an einem Shimadzu 2101 Gerät aufgenommen.

Absorptionsspektren bei 77K wurden an der Universität Mainz am Institut für Allgemeine Botanik erstellt. Hierbei wurden in einem Selbstbaukryostaten kommerzielle Plastikkuvetten (1 x 0.5mm) mit flüssigem Stickstoff in Kontakt gebracht, durch die Verwendung von Plastikkuvetten entstehen beim Einfrieren keine Risse, so dass auch gering konzentrierte Proben vermessen werden konnten, wie sie in den Banden aus dem Saccharose-Dichtegradienten zur Verfügung standen. Die Spektren wurden an einem Shimadzu 2101 Gerät aufgenommen, hierbei immer 9 Messungen gemittelt; die Proben wurden auf 60% Glycerin und 40mM HEPES pH 7.6 gebracht.

2.12.2 Subbandenanalyse der Absorptionsspektren

Das Fitting der Tieftemperatur-Absorptionsspektren durch einzelne Subbanden wurde von Axel Schubert durchgeführt (Schubert et al., in Vorbereitung). Hierbei wurde ein Programm verwendet, welches am Max-Born-Institut für Nicht-lineare Optik und Kurzzeitspektroskopie, Berlin, entwickelt wurde. Als Form für die Subbanden dienten Voigt-Profile, vgl. Diskussion 4.6. Das Gesamtspektrum wird durch einfache Addition der Subbanden errechnet.

2.12.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren bei Raumtemperatur wurden an einem Hitachi F-4500 Gerät erstellt. Die Anregung erfolgte im Chl *b* Bereich bei 469nm (1nm Bandbreite), der Detektionsspalt war auf 2.5nm Bandbreite eingestellt. Die Dimension der Küvette betrug 1 x 0.5cm.

Fluoreszenzspektren bei 77K wurden an einem FluoroMax-2 (ISA-Instruments) des Instituts für Botanik der Universität Mainz aufgenommen. Die Spaltbreite für Anregung und Emission betrug 3nm Bandbreite, die Anregungswellenlänge 469nm. Die Proben wurden in zylindrischen Beckman Ultrazentrifugenröhrchen (5 x 41mm) in einem Glasdewar eingefroren, der mit flüssigem Stickstoff gefüllt war.

2.12.4 Circular dichroismus

CD Spektren der Chl *b* Komplexe wurden am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Mainz an einem Jasco J-810 Gerät bei Raumtemperatur aufgenommen, die spektrale Bandbreite betrug 3nm, die Schichtdicke der Küvette 1cm, es wurden je 5 Messungen gemittelt.

CD Spektren aus Kapitel 3.3.1 wurden am Max-Born-Institut in Berlin an einem Jobin Yvon Autodichrograph 5 bei Raumtemperatur aufgenommen, die spektrale Bandbreite betrug 2nm, die Schichtdicke der Küvette 1cm.

2.13 Strukturelle Analyse

2.13.1 Zweidimensionale Kristallisierung von rekombinantem LHC-II

Die LHC-II Fraktion, die von der Ni-Affinitätssäule eluiert wurde, konnte direkt zur Kristallisation verwendet werden. Diese wurde durch Verdünnen auf das zweifache Volumen mit 0.3 M KCl (Endkonzentration) ausgefällt, so dass sich im 50 µl Kristallisationsansatz eine Chl Konzentration von 1 g/l ergab. Das Pellet wurde mit Wasser gewaschen in Puffer ohne Glycerin gelöst; die Triton Menge wurde bei diesem Schritt so eingestellt, dass sich eine zufriedenstellende Solubilisierung ergab. Schließlich wurde Glycerin zugegeben und der Ansatz 2h bei 37°C inkubiert. Die Konzentrationen im Ansatz betrugen, 40% Glycerin, 10mM Glycin, pH 7.0, 0.6% Triton X-100, 0.3g/l Digalactosyl-diacyl-glycerin (Fluka).

2.13.2 Elektronenmikroskopie von zweidimensionalen Kristallen

Eine Probe aus dem Kristallisationsansatz wurde auf ein mit Kohlefilm belegtem Kupfernetzchen aufgetragen und nach einer Minute mit Filterpapier abgesaugt. Dies wurde sofort mit 2% Uranylacetat, 0.1% Triton X-100 gewaschen, dann mit dieser Färbelösung eine Minute inkubiert. Die Aufnahmen wurden an einem Philips CM-12 Mikroskop bei 35000facher Vergrößerung erstellt.

2.13.3 Bildprozessierung

Die Güte der Kristallabbildungen auf den EM Negativen wurde zuerst mit Hilfe der optischen Beugung im Laserlicht bewertet, beugende Bilder dann an einem Zeiss SCAI Scanner mit 7µm Auflösung digitalisiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen des MRC Programmpaketes (Crowther et al., 1996).

Ziel der Bildverarbeitung ist die Verbesserung des Signal/Rausch Verhältnisses, Ausgleich von Verzerrungen des Kristallgitters, Korrektur der Kontrastübertragungsfunktion des Elektronenmikroskops, und schließlich die Darstellung der Kristalleinheitszelle, also einer Elektronendichtekarte des untersuchten Moleküls.

Die digitalisierten Bilder wurden bei einer nominellen Auflösung von 15 Å prozessiert. Da die verwendeten Bilder der negativ kontrastierten Proben nur Beugungsreflexe bis zur 3. oder 4. Ordnung zeigten, wurden die Verzerrungen im Kristall in nur jeweils einem Durchlauf verbessert („unbending“). Auf eine Korrektur der Kontrastübertragungsfunktion des Mikroskopes wurde verzichtet, da diese bei der gegebenen niedrigen Auflösung noch nicht zur Phasenumkehr einzelner Beugungsreflexen führte. Nach Applizierung der P321 Kristallsymmetrie wurden die Beugungsreflexe der Bilder vereinigt und daraus eine Projektionskarte berechnet.

2.14 Chlorophyllaustausch an nativem LHC-II

Chlorophyllderivate wurden freundlicherweise von Hugo Scheer, Institut für Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Zum Austausch einzelner Chlorophylle am nativen LHC-II Komplex wurde in einem 0.1ml Ansatz 0.5g/l LHC-II mit 10 O.D.ml Einheiten Chlorophyllderivat (entsprechend 1g/l) mit 1% Octylglucosid, 10% Ethanol und 20mM Tris-Cl pH 7.5 für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Pigmente wurden hierzu zuvor in Ethanol unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades gelöst. Nach dem Einbau wurde die Lösung 5min bei 13000 U/min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand auf eine 0.1ml DEAE Sepharose CL-6B Säule (Pharmacia) aufgetragen. Überschüssige Pigmente wurden mit 1.5ml 1% Octylglucosid und 20mM Tris pH 7.5 entfernt, die Elution erfolgte in dem gleichen Puffer mit 0.3M NaCl.

Für Raumtemperaturspektren wurde das Eluat 1:40 in 0.03% Dodecylmaltosid, 15mM NaCl, 10mM Tris-Cl pH 8.0 verdünnt, für Tieftemperaturspektren 1:6 auf 60% Glycerin, 50mM HEPES pH 7.6 und 0.03% Dodecylmaltosid.

2.15 Materialien

2.15.1 Bezugsquelle für Chemikalien

Soweit im Text nicht anders angegeben:

Allgemeine Chemikalien (Salze etc.): Merck

Lösungsmittel: Roth

Triton X-100, „Membranqualität“: Boehringer Mannheim (jetzt Roche)

Octylglucosid: Calbiochem

Dodecylmaltosid: Calbiochem

Desoxycholsäure: Sigma

Li-dodecylsulfat: Sigma

Igepal (Nonidet P40): Sigma

IPTG: Boehringer Mannheim

2.15.2 Firmenverzeichnis

Alltech, 82008 Unterhaching, Tel. 089/615230-0

Amicon, Witten, Tel. 02302/960600

Biocomp, Fredericton New Brunswick, Canada, Tel. (506)453-4812

Biorad, 80939 München, Tel. 089/31884-0

Boehringer Mannheim, 68305 Mannheim, Tel. 0621/759-8545

Calbiochem, 65812 Bad Soden, Tel. 06196/63955

Fluka, Wunstorfer Str. 40, 30926 Seelze, Tel. 05137/8238-0

Grom, Herrenberger Str. 54, 71083 Herrenberg, Tel. 07032/990450

Merck, 64293 Darmstadt, Tel. 06151/72-0

Microfluidics Corporation, Newton, Massachusetts, USA

MWG Biotech, 85560 Ebersberg, Tel. 08092/8289-0

Pharmacia, 79111 Freiburg, Tel. 0761/4903-0

Roth, 76185 Karlsruhe, Tel. 0721/5606-0

Schleicher & Schuell, D-37582 Dassel, Tel. 05561/791-0

Seqlab, 37085 Göttingen, Tel. 0551/3700010

Sigma, 82041 Deisenhofen, Tel. 089/6513-0

Stratagene, 1101 CB Amsterdam, Tel. Deutschland: 0699 509 6197

Waters, Haupstr. 7, D65760 Eschborn, Tel. 06196/400600

Whatman, Göttingen, Tel. 0551/504330

3 Ergebnisse

3.1 Expression des Lhcb1*2 Polypeptids in *E. coli*

E. coli Stämme, die mit LHC-II tragenden Expressionsplasmiden transformiert wurden, bildeten nach der Induktion durch Isopropyl-thio- β -galaktosid (IPTG) Einschlusskörper. Hierbei handelt es sich um Proteinaggregate aus dem exprimierten Polypeptid, welche bis zu $\frac{1}{3}$ der Zelle ausfüllen können (Abb. 13). In der länglichen *E. coli* Zelle, welche fast den gesamten Bildausschnitt ausfüllt, sind zwei Einschlusskörper als dunkle Bereiche zu erkennen.

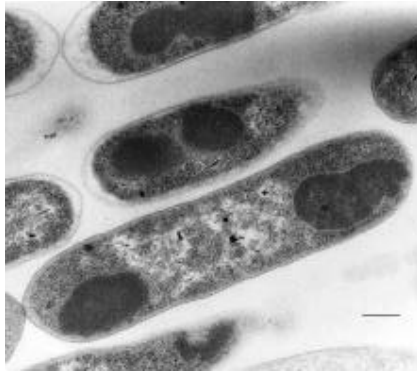


Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnitts von *E.coli* Zellen, welche LHC-II Polypeptid exprimieren. Balken entspricht 300nm.

In allen verwendeten Stämmen konnte ein hohes Expressionsniveau erzielt werden, wenn in der späten logarithmischen Phase mit 1mM IPTG induziert wurde, und die Kulturen weitere 4h geschüttelt wurden.

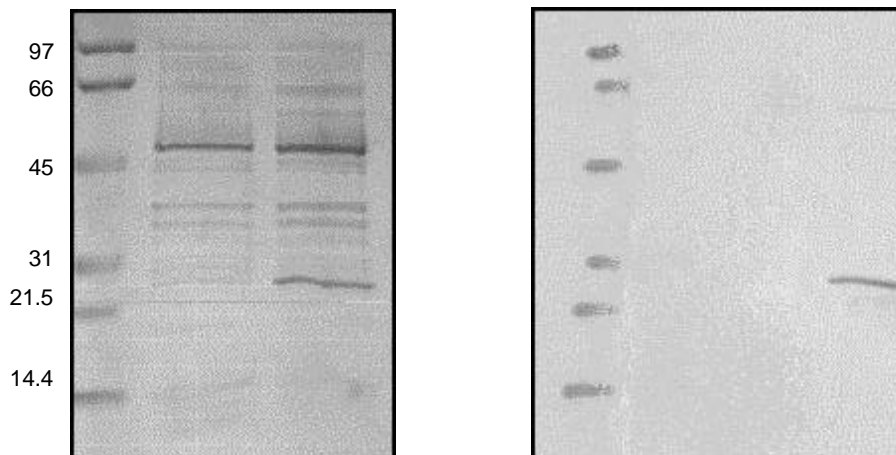


Abb. 14: Links: SDS-Gel von induzierten *E. coli* Zellen (rechte Spur), nicht induzierten *E.coli* Zellen (mittlere Spur) und Markerproteinen (linke Spur) mit Größe in kDa. Rechts: Western Blot eines Gels identisch zu dem links gezeigten, ebenso die farbstoffgekoppelten Standardproteine (linke Spur); verwendeter Antikörper: polyklonaler Anti-LHC-II #110 (Nußberger, 1994).

Die Expression wirkte sich hierbei nur unwesentlich vermindern auf das Wachstum der Kulturen aus. Das LHC-II Polypeptid wurde durch SDS-PAGE detektiert: In Abbildung 14 links ist in einem Gel, in dem das Gesamtprotein der Zellen analysiert wurde, nach der Induktion eine neue Bande zu erkennen (Pfeil). Anhand ihres Molekulargewichts von 26 kDa wurde sie als das exprimierte LHC-II Polypeptid identifiziert. Ein Western Blot, der mit Anti-LHC-II Antikörpern durchgeführt wurde, bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 14, rechts).

Ein schneller und zuverlässiger Indikator für das Vorhandensein von Einschlusskörpern war ein weißes statt bräunliches Zellpellet, das man nach Zentrifugation einer kleinen Probenmenge aus der Kultur erhielt.

Im Falle der Mutanten zeigten nur ca. die Hälfte der auf Ampicillinwachstum selektierten Transformanten auch Proteinexpression. Die exprimierenden Klone wurden deshalb zur weiteren Verwendung selektiert. Eine mögliche Ursache dieses Phänomens ist eine fehlerhafte PCR Replikation des Plasmids, so dass Abschnitte, welche für die Expression wichtig sind, deaktiviert wurden, die Ampicillinresistenz jedoch beibehalten wurde. Da die Expression der LHC-II Einschlusskörper für die Bakterien nachteilhaft ist, ist eine Selektion auf solche Mutationen hin zu erwarten. Im Falle der Mutante Q197A (Chl *a3*) konnten bei 18 untersuchten Klonen keine Expression detektiert werden, die Verwendung der Mutation Q197L führte dann zum gewünschten Erfolg; hier ist ein Abbau des Produkts der Q197A Mutation auf RNA Ebene denkbar.

3.2 Faltung von trimerem LHC-II

3.2.1 Faltung durch Detergenzpräzipitation und -dialyse

LHC konnte reproduzierbar und routinemäßig zu trimeren Komplexen rückgefaltet werden. In Abbildung 15 sind die wichtigsten Schritte durch Auftrag der Proben auf ein Nativgel oder sogenanntes „grünes Gel“ gezeigt, welches die gefalteten, pigmentbindenden Proteinspezies intakt lässt; diese sind dann bereits ohne Färbung als grüne Banden auf dem Gel zu erkennen.

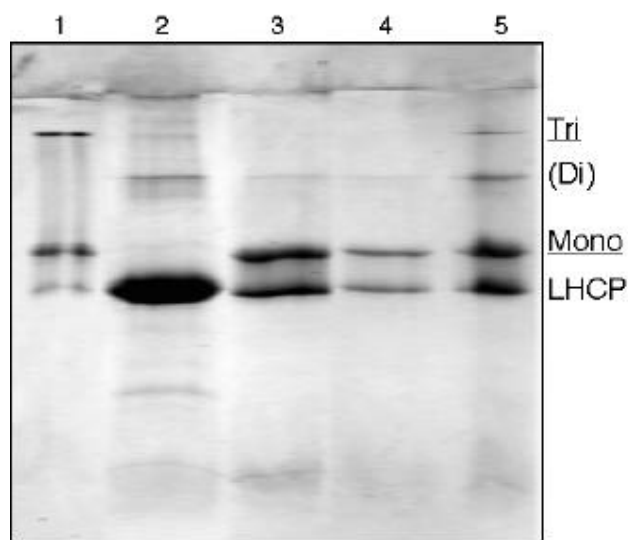


Abb. 15: Coomassie-gefärbtes Nativgel der Proben einer LHC-II Rekonstitution; LHCP: LHC Apoprotein, Mono: pigmentiertes Monomer, Di: nicht pigmentiertes Dimer-Aggregat, Tri: pigmentiertes Trimer; die Banden mit unterstrichener Bezeichnung waren bereits vor der Färbung grün zu erkennen. Spur 1: nativer LHC aus Erbse, Spur 2: gereinigte Einschlusskörper, Spur 3: mit Pigmenten und nach Fällung des Dodecylsulfates, Spur 4: vor der Dialyse, Spur 5: nach der Dialyse.

Das gereinigte Apoprotein aus den Einschlusskörpern wurde mit Hilfe von Lithium-dodecylsulfat aufgelöst und mit Pigmenten versetzt. Die Faltung zu monomeren Komplexen erfolgte durch den Austausch des Detergenz von Dodecylsulfat zu Octylglucosid (Paulsen et al., 1993). Im Nativgel in Abbildung 15 ist zu sehen, wie nach der Ausfällung des Dodecylsulfats eine monomere, pigmentierte LHC-II Bande entsteht (Spur 3). Im Gegensatz zu dem publizierten Protokoll (Hobe et al., 1994) wurde auf eine weitere Reinigung der Monomere verzichtet. Die Bildung von Trimeren wurde in Gegenwart des Lipids Phosphatidylglycerin durch Ausfällen des Proteins induziert, welche durch die Entfernung des Detergenz durch Dialyse und durch Aufkonzentrierung der Probe erreicht wurde. Nach diesem Schritt ist in Abbildung 15 deutlich eine Trimerbande auf dem Gel zu erkennen (Spur 5). Für eine weitere biochemische Bearbeitung ist die Solubilisierung des so erhaltenen Pellets und die Aufreinigung der enthaltenen Trimere nötig.

3.2.2 Faltung auf einer Nickel-Affinitätssäule

Alternativ zum oben beschriebenen Protokoll konnte Protein, welches mit einer Hexahistidinmarkierung („His-tag“) C-terminal versehen war, auf einer mit Nickel beladenen Metallaffinitätssäule rückgefaltet werden. Dadurch konnte der Faltungs- und Reinigungsvorgang auf wenige Stunden verkürzt werden. Interessanterweise konnte das

Protein mit N-terminaler Histidinmarkierung (Klon 44.C3; Kosemund, 2000) nicht an die Säule gebunden werden, und deshalb auch nicht nach diesem Protokoll rückgefaltet werden.

Das Apoprotein aus den Einschlusskörpern wurde in Harnstoff aufgelöst und an die Säule gebunden. Der Detergenzwechsel und die Zugabe von Pigmenten und Lipiden erfolgte durch Waschen der Säule mit entsprechenden Puffern. Die Faltung des Proteins zeigte sich dadurch, dass die Säule nach der Applikation der Chlorophylle eine grüne Farbe behielt, welche als deutlich abgegrenzte Zone mit Imidazol eluiert werden konnte.

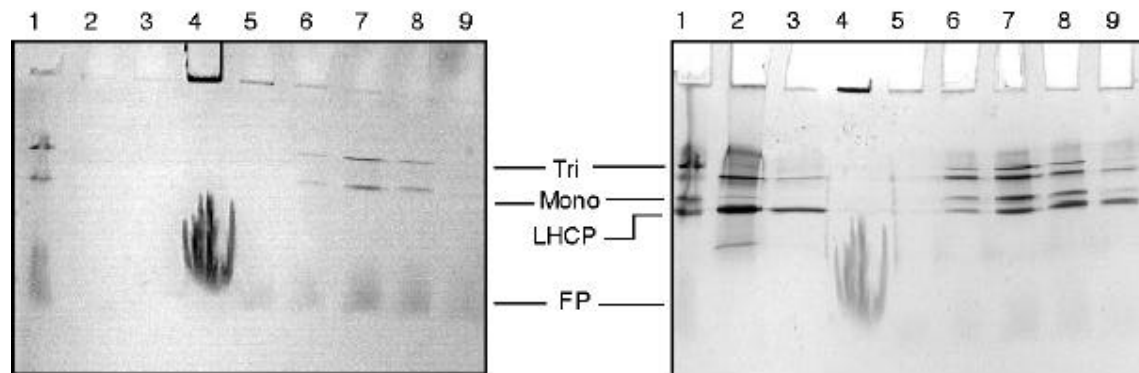


Abb. 16: Links: Nativgel der Fraktionen, die von der Nickel-Affinitätssäule eluiert wurden; Rechts: gleiches Gel nach Coomassiefärbung; Tri: pigmentiertes Trimer, unterhalb des Trimers befindet sich das nicht pigmentierte Dimer-Aggregat, vgl. Text, Mono: pigmentiertes Monomer, LHCP: LHC-II Apoprotein, FP: freie Pigmente. Spur 1: Nativer LHC aus Erbse, Spur 2: gelöste LHC Einschlusskörper, die auf die Säule aufgetragen wurden, Spur 3: Waschschrift mit LDS Puffer, Spur 4: Waschschrift mit OG2 Puffer, Spuren 5-9: Elutionsfraktionen des gefalteten Proteins.

Ein Vorteil der Faltung des auf der Ni^{2+} -Säule gebundenen Proteins besteht darin, dass überschüssige, nicht gebundene Pigmente abgetrennt werden. Die Bindung an das Säulenmaterial verhindert außerdem die Aggregation der entfalteten Proteinketten, in Analogie zu Chaperon Proteinen in einer lebenden Zelle. In Abbildung 16 ist die Säulenfaltung mittels eines grünen Nativgels gezeigt, pigmentierte Proteinspezies waren hierbei bereits ohne Färbung des Gels als grüne Banden erkennbar (Abb. 16, links). Im Coomassie gefärbten Gel (Abb. 16, rechts) ist erkennbar, dass das um sechs Histidinreste verlängerte rekombinante Protein (Spur 2) etwas stärker im Gel retardiert wird als die native LHCP Bande in Spur 1. Da die aufgetragenen Einschlusskörper (Spur 2) bereits im ersten Waschschrift teilweise abgewaschen wurden (Spur 3), zeigte dies, dass Protein im Überschuss aufgetragen wurde und die Säule maximal beladen war. Wurde die Ausbeute der Faltung in Abhängigkeit der verwendeten Polypeptidkonzentration titriert, so wurde eine lineare Abhängigkeit bis zu 1mg/ml Proteinkonzentration gefunden (Abb. 17), so dass dieser Wert in allen weiteren Versuchen verwendet wurde. Da Chlorophyll nur über LHC Protein an die

Nickel-Säule bindet, war die Chlorophyllkonzentration der mit Imidazol eluierten Fraktion (wie in Abb. 17 gezeigt) ein gutes Maß für die Proteinbeladungsdichte der Säule.

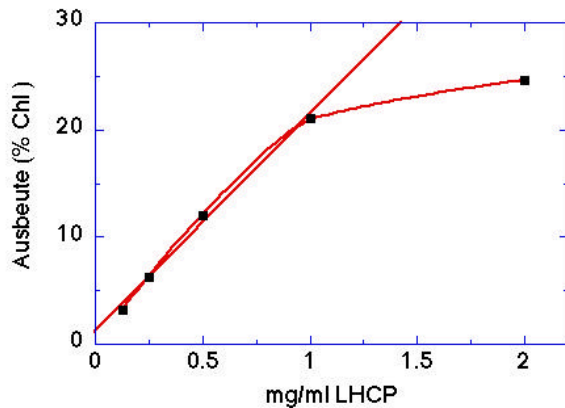


Abb. 17: Faltungsausbeute in Abhängigkeit der eingesetzten Apo-Protein-Konzentration. Gezeigt ist die Chlorophyllkonzentration der Elutionsfraktion, welche nach Faltung und Waschen aufgefangen wurde, und den gefalteten LHC-II enthält. Y-Achse: Eluierte Chlorophyllmenge in Prozent des im Faltungsansatz vorhandenen Chlorophylls (0.5mg/ml).

Nach Zugabe der Pigmente wurden die nicht gebundenen Chlorophylle und Carotinoide abgewaschen (Abb. 16, Spur 4), die Elution des Proteins von der Säule erfolgte dann mit Imidazol in Gegenwart des zur Trimerisierung notwendigen Lipids Phosphatidylglycerin (Abb 16, Spuren 5-9). Deutlich ist im Coomassie gefärbten Gel unterhalb der Trimerbande eine weitere nicht pigmentierte Proteinbande zu erkennen. Bei Auftrag der Probe auf eine reguläres SDS-Gel zeigte diese Bande ein Molekulargewicht von 54 kDa, so dass sie mit einem LHC-II Dimer Aggregat korrespondiert (siehe Abschnitt 3.3). Obwohl in den eluierten Fraktionen gleichzeitig Trimere, Monomere und nicht oder unvollständig gefaltetes Protein vorhanden war, war bereits hier Energietransfer des Komplexes von Chl *b* zu Chl *a* durch ein Fluoreszenzspektrum nachweisbar (ohne Abb., vgl. Rogl et al., 1998). Auch konnte diese Fraktion bereits dazu benutzt werden, zwei-dimensionale Kristalle zu induzieren (siehe Kapitel 3.3.3). Zur weiteren biochemischen Charakterisierung wurden jedoch Monomere und Trimere durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von nicht oder unvollständig gefaltetem Protein abgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.1).

Als weitere Möglichkeit wurde die Kombination der beiden Faltungsprotokolle getestet: Hierbei wurde der Überstand der durch Detergenzpräzipitation gefalteten Monomere auf die Nickelaaffinitätssäule aufgetragen, um die Trimerisierung zu induzieren. Diese Methode lieferte eine gute Ausbeute an trimeren Komplexen, die jedoch nicht höher als die besten

Versuche der kompletten Säulenfaltung war. Die Beladungsdichte der Säule mit korrekt gefalteten Monomeren ist in diesem Falle wahrscheinlich höher als im ursprünglichen Säulenfaltungsprotokoll, weil keine ungefalteten Proteine die Bindungsplätze blockieren.

3.3 Eigenschaften des *in vitro* gefalteten LHC-II - Nachweis des nativen Zustandes

Um nachzuweisen, dass der *in vitro* gefaltete LHC-II mit dem nativ isolierten identisch ist, wurde dessen Oligomerisierungszustand, seine Pigmentbindung, die spektroskopischen Eigenschaften und die Struktur untersucht. Die Pigmentbindungsdaten sind hierbei im Abschnitt 3.6, im Vergleich mit den Mutanten dargestellt.

3.3.1 Quartärstruktur

Wie bereits im Abschnitt 3.2 beschrieben, konnte der rückgefaltete LHC-II trimerisiert werden. Dies wurde durch eine entsprechende Bande auf einem „grünen Nativgel“ gezeigt (siehe Abb. 15,16). Nach Coomassiefärbung eines solchen Gels waren auch die ungefalteten Proteinmonomere sichtbar, außerdem auch eine nicht pigmentierte Bande, welche von ihrem apparenten Molekulargewicht mit einem Dimer korrespondierte. Diese Bande wurde durch die Behandlung mit reduzierendem DTT abgeschwächt, so dass eine Beteiligung des Cysteins 79 an einer Disulfidbrücke wahrscheinlich ist. War in dem Gel ein starker Chlorophyllhintergrund vorhanden, wurde diese Bande dadurch grün angefärbt. Das bedeutet also, dass auch entfaltetes Protein bereits Chlorophyll bindende Eigenschaften zeigt, wie es in diesem Fall an den Dimer-Aggregaten beobachtet wurde.

Der trimere Zustand des LHC-II konnte durch Zentrifugation auf einem Saccharose-Dichtegradienten nachgewiesen werden. In Abbildung 18, links ist als Vergleich das Ergebnis mit nativem, aus der Pflanze isoliertem LHC-II gezeigt. Bei den zwei Hauptbanden A und B in der Mitte des Gradienten handelt es sich jeweils um Monomer und Trimer, was durch ein Nativgel nachgewiesen wurde. Bande C besteht aus Chlorophyll *a* Aggregaten, welche eine typische langwellige Absorption bei 740nm zeigen (Katz et al., 1991). Bande D enthält wiederum LHC-II Trimere, aufgrund der Position weit unten im Gradienten handelt es sich wahrscheinlich um definierte Aggregate von LHC-II Trimeren, wie z.B. bei Dekker et al., 1999 beschrieben. Die monomere und trimere Bande A und B findet man ebenso in einem Gradienten, auf den ein Rückfaltungsansatz von rekombinant hergestellten Komplexen aufgetragen wurde (Abb.18, rechts). Deren Identität konnte durch ein Nativgel nachgewiesen werden (ohne Abb.). Bande 1 ganz oben besteht aus freien Pigmenten und enthält kein Protein.

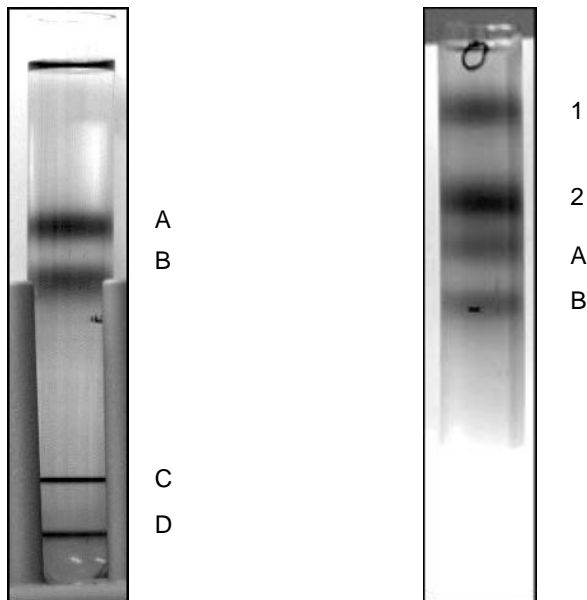


Abb. 18: Sacharosedichtegradienten-Zentrifugation von nativem LHC-II (links) und rekombinantem LHC-II (rechts). Bandenzuordnung: vgl. Text; LHC Monomere: Bande A, LHC Trimere, Bande B.

Bei den *in vitro* gefalteten Komplexen wurde zusätzlich eine grüne Bande 2 direkt über den Monomeren gefunden. Deren Chl *a/b* Verhältnis war deutlich erhöht, die HPLC Analyse ergab die Bindung von nur 2-3 Molekülen Chl *b* und 6-8 Molekülen Chl *a* pro Monomer (Bezug: 2 Luteine pro Monomer). In einem Nativgel konnte sie als pigmentierte Monomerbande detektiert werden. Rezentrifugiert man die Bande 2 und Bande A, migrieren die Fraktionen wieder auf der gleichen Höhe, wie zuvor (Abb. 19). Da die Banden auf dem verwendeten Gradienten nicht vollständig voneinander getrennt werden, ist auch bei der Rezentrifugation noch ein kleiner Anteil der jeweils anderen Spezies zu sehen.

Beide Banden waren gegenüber 30 min Thermolysinbehandlung (Kosemund, 2000) stabil. Da laut HPLC Analyse vor allem der Chl *b* Gehalt Bande stark erniedrigt ist, handelt es sich offensichtlich um unvollständig oder falsch gefaltetes Protein, in welchem nicht alle Pigmentbindungsstellen besetzt wurden.

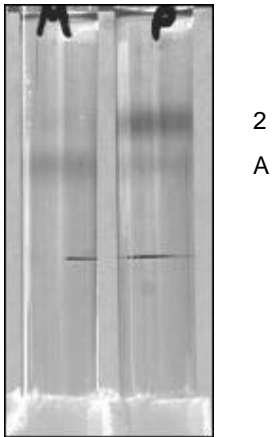


Abb. 19: Re-Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten der Banden 2 und 3 aus Abb. 18.

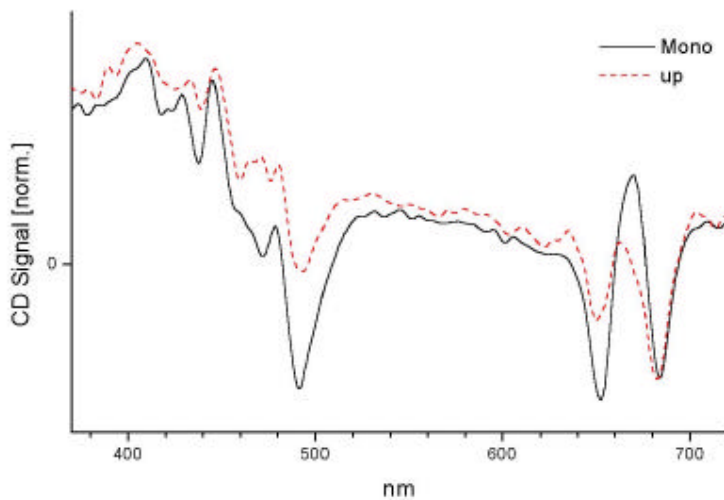


Abb. 20: CD Spektrum (Raumtemperatur) von rückgefalteten LHC-II Monomeren und der Bande 2 (up), welche im Saccharosedichtegradienten über den Monomeren läuft. Die Spektren sind auf das Absorptionsmaximum der Q_y Bande bei 674nm normiert.

Sowohl das CD Spektrum der LHC-II Monomere (Bande A), als auch der Bande 2 im Saccharosegradienten zeigen die LHC spezifischen Signale bei 492nm, 653nm und 684 nm (Abb. 20). Die negative Bande bei 655nm ist in der Bande 2 des partiell gefalteten LHC-II geringer ausgeprägt, weil auch deren Chl *b* Gehalt entsprechend geringer ist. Die CD Spektren wurden auf das Absorptionsmaximum der jeweiligen Proben normiert: Die drei negativen CD Signale zeigen, dass die Pigmente spezifisch auch in Bande 2 an das LHC Protein gebunden sind. Freie Chlorophylle in Lösung haben dagegen deutlich kleinere CD

Signale. Aggregierte Pigmente in Detergenzmizellen liefern zwar ähnlich starke CD Signale wie LHC-II, jedoch treten die drei für LHC-II typischen Minima nicht auf. (Hobe, 1995a)

3.3.2 Spektroskopie

Da die Hauptaufgabe des LHC-II im Transfer von Lichtenergie besteht, wurde diese Funktion mit spektroskopischen Methoden untersucht. In Abbildung 21 ist ein Absorptionsspektrum von nativem und rekombinantem LHC-II bei Raumtemperatur gezeigt.

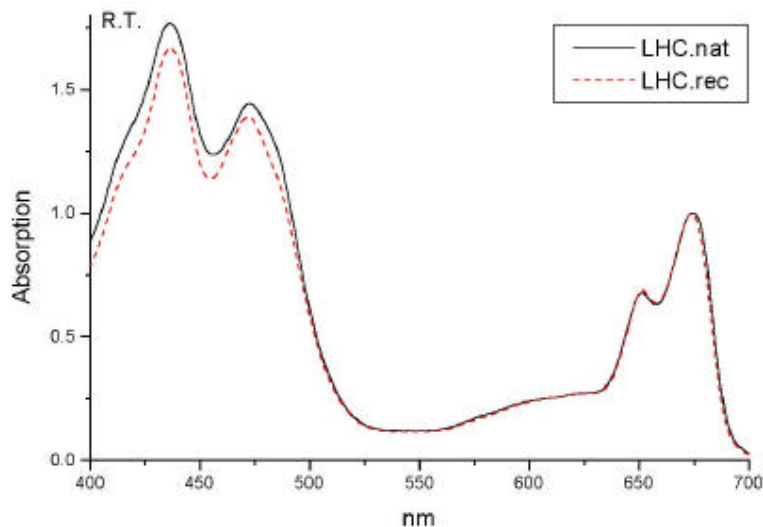


Abb. 21: Absorptionsspektren von nativem (nat.) und rekombinantem (rec.) LHC-II bei Raumtemperatur.

Die am LHC-II gebundenen Chlorophylle zeigen in der Proteinumgebung eine spezifische Absorption, welche sich von einer entsprechenden Pigmentmischung in organischem Lösungsmittel oder in Detergenzmizellen unterscheidet. Denaturiert man LHC-II in 1% SDS, so geht die charakteristische Rotverschiebung des Chlorophyll *a* Q_y Peaks von 674 nm zurück auf 668 nm. Auch der Chlorophyll *b* Peak, welcher im nativen LHC-II einen Seitengipfel bei 652nm bildet, ist nach Denaturierung nur noch als Schulter erkennbar. Im Absorptionsspektrum in Abbildung 21 ist gezeigt, dass rekombinant hergestellter LHC-II die spezifischen Eigenschaften des nativen Komplexes aufweist.

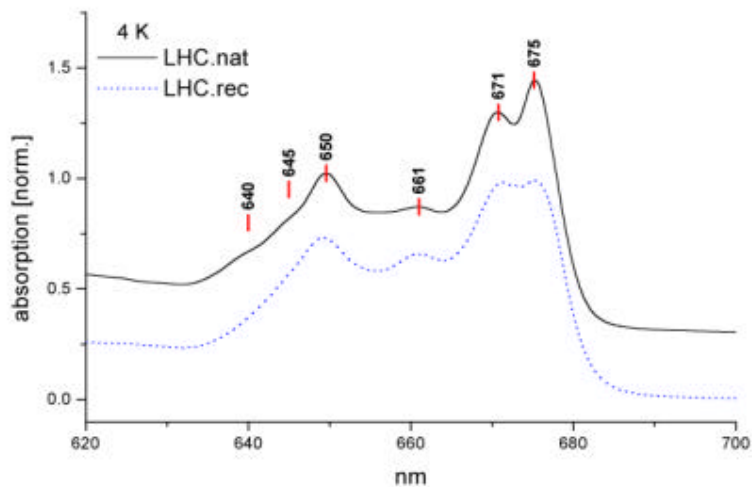


Abb. 22: Absorptionsspektrum von nativem LHC-II aus Erbse (LHC.nat) und rekombinatem, rückgefalteten (LHC.rec) bei 4 K.

Ein Absorptionsspektrum mit höherer Auflösung erhält man bei tiefer Temperatur, da hier keine thermische Verbreiterung der Absorptionspeaks der einzelnen Chlorophylle stattfindet. In Abbildung 22, in der die Absorption des nativen mit rekombinantem LHC-II bei 4 K verglichen ist, ist der Chlorophyll *a* Bereich nun in zwei Maxima bei 675nm und 671nm aufgelöst. Der nächste Peak bei 661nm kann nicht eindeutig dem Chlorophyll *a* oder *b* zugeordnet werden, es erscheint jedoch eine Beteiligung beider Chlorophyllsorten wahrscheinlich (siehe Abschnitt 3.5.4 und 3.6.3). Im Chlorophyll *b* Bereich findet man ein Maximum bei 650nm, nur im nativen Komplex erkennt man auch zwei Schultern bei ca. 645 und 640 nm. Eine mögliche Ursache dafür liegt in der höheren technischen Qualität des Nativspektrums, da die native Probe 3 mal höher konzentriert war (O.D.=1) und deshalb besser über dem Hintergrund von ca. 0.5 Absorptionseinheiten der gefrorenen Probe gemessen werden konnte. Jedoch erscheinen auch Inhomogenitäten im rekombinanten Komplex wahrscheinlich, welche durch Unterschiede im Detergenz- und Lipidgehalt bedingt sein können. Ein Fitting der Absorption einzelner Chlorophyllmoleküle an das Gesamtspektrum findet sich in Abschnitt 4.6.

Mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrums kann die Funktionsfähigkeit des LHC-II untersucht werden: Hierbei wird Chlorophyll *b* in der Soret-Bande bei 469nm angeregt. Bei vollständiger Energieübertragung emittiert nur langwelliges Chlorophyll *a* bei 680nm. Dies ist ein Maß für die Intaktheit des Komplexes. In Abbildung 23 ist der Vergleich von nativem LHC-II, rekombinantem LHC-II, und der Pigmentmischung in Detergenz gezeigt. Da auch in einer

Detergenzmizelle Chlorophyll *a* und *b* in Kontakt sein können, findet hier ein teilweiser Energietransfer auf Chlorophyll *a* statt. Da Chl *a* ohne proteinbedingte Rotverschiebung bei ca. 675 nm emittiert, äußert sich dies im Gesamtspektrum in einer Verbreiterung der Chlorophyll *b* Emission (658 nm) an der langwelligen Flanke. (Siehe auch Abschnitte 3.5.2, 3.5.4 und 3.6.2).

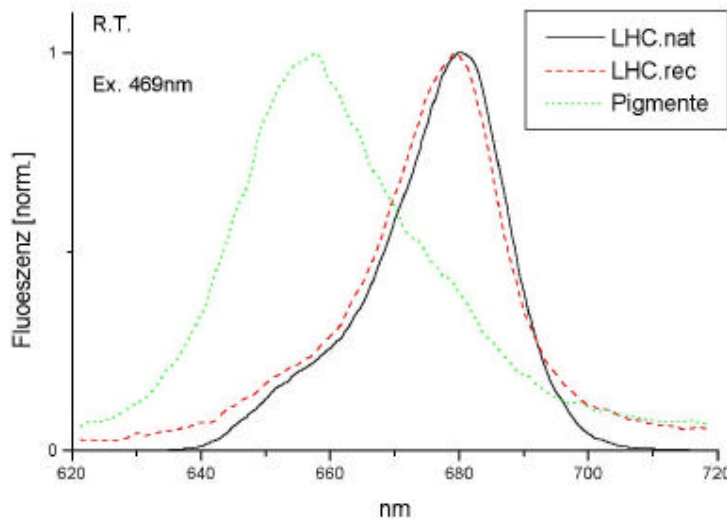


Abb. 23: Fluoreszenzemissionsspektren bei Raumtemperatur von rekombinantem (rec.) und nativem (nat.) LHC-II. Als Referenz ist auch das Spektrum der freien Pigmente in 0.1% Dodecylmaltosid gezeigt. Anregung bei 469nm (Chl *b*).

3.3.3 Kristallisation

Mit dem auf der Nickel-Säule rückgefaltete LHC-II Komplex, welcher am C-Terminus hexa-Histidin-markiert war, konnten zwei-dimensionale Kristalle gebildet werden. Die Analyse im Elektronenmikroskop zeigte, dass die Kristalle bei der gegebenen Auflösung identisch zu denen aus nativem LHC-II waren; dies lässt auf eine strukturelle Identität zwischen rekombinantem und nativem Protein schließen.

Die Kristalle konnten bereits mit dem Material gebildet werden, welches ohne weitere Aufreinigungsschritte von der Nickel-Affinitätssäule eluiert wurde (Abb. 24). Auf Grund des hohen Kontrastes der Aufnahme kann man davon ausgehen, dass es sich um einen Kristall handelt, der aus mehreren Schichten besteht. Dies behindert jedoch die Datenauswertung in der Projektion nicht, solange die Schichten im Register aufeinanderliegen und die Aufnahmen ohne Kippung der Probe gemacht werden.

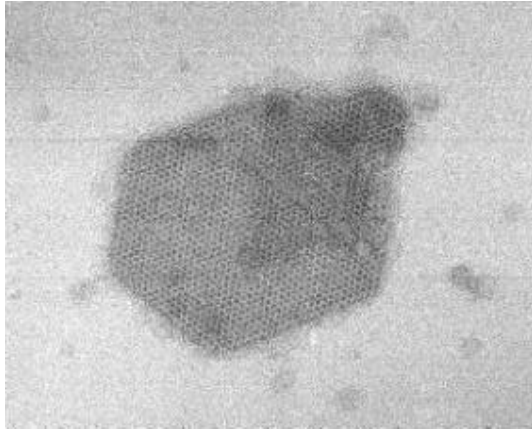


Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines negativ kontrastierten Kristalls aus Histidin-markiertem, rückgefaltetem LHC-II. Kristalldurchmesser: ca. $0.8\mu\text{m}$.

In Abbildung 25 ist die Fourier Transformation, also das berechnete Beugungsbild eines negativ kontrastierten Kristalls gezeigt. Alle verwendeten Bilder zeigten Beugungsbilder ähnlich dem hier abgebildeten. Reflexe mit gutem Signal/Rausch Verhältnis sind bis zur vierten Beugungsordnung zu erkennen, was bei einer Einheitszelle von 130\AA einer Auflösung von ca. 30\AA entspricht. Anhand des Beugungsbildes erkennt man die hexagonale Kristallpackung, welche sich auch in der makroskopischen Form der Kristalle manifestiert. Zur Bildverarbeitung wurde die von den Nativkristallen bekannte zweidimensionale Raumgruppe P321 verwendet.

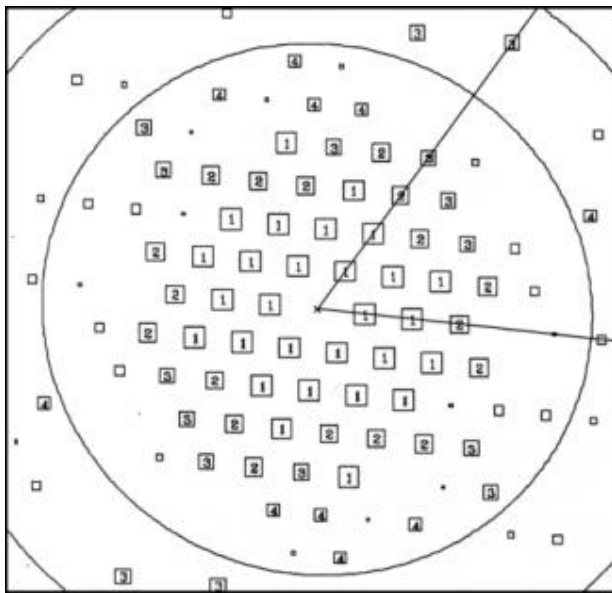


Abb. 25: Fouriertransformation einer elektronenmikroskopischen Kristallabbildung. Die Achsen entsprechen den reziproken Gittervektoren. Die Größe der Kästchen (Nummern) entsprechen der Güte des jeweiligen Beugungsreflexes, wobei große Kästchen (kleine Nummern) eine hohes Signal/Rausch Verhältnis anzeigen.

Drei prozessierte Bilder wurden zusammengefasst, um eine Projektionskarte der zugehörigen Kristalleinheitszelle zu berechnen, wie in Abb. 26 dargestellt. Die Karte wurde bei einer Auflösung von 15Å berechnet, der verwendete B-Faktor betrug -4000.

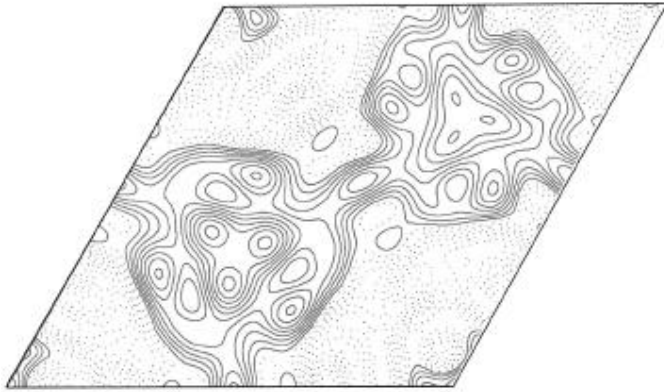


Abb. 26: Elektronendichtekarte der Einheitszelle der rekombinanten LHC-II Kristalle. Proteinstrukturen sind hierbei mit durchgezogenen Linien dargestellt. Die Größe der Einheitszelle beträgt 129.5Å x 129.5Å. Symmetrieverwandte Regionen wurden entsprechend der P321 Raumgruppe gemittelt. Verwendeter B-Faktor: -4000. Auflösung: 15Å.

Die Packung der Kristalle und die Anordnung der Elektronendichte innerhalb der Einheitszelle entspricht den Beobachtungen im Nativkomplex (vgl. Abschnitt 4.2). In der Einheitszelle sind zwei LHC-II Trimere enthalten. Zwei verschiedene Trimerorientierungen sind zu erkennen, da die Trimere im zwei-dimensionalen Kristall jeweils nach unten und nach oben orientiert sind, was durch die Symmetrie der Kristallraumgruppe vorgegeben ist.

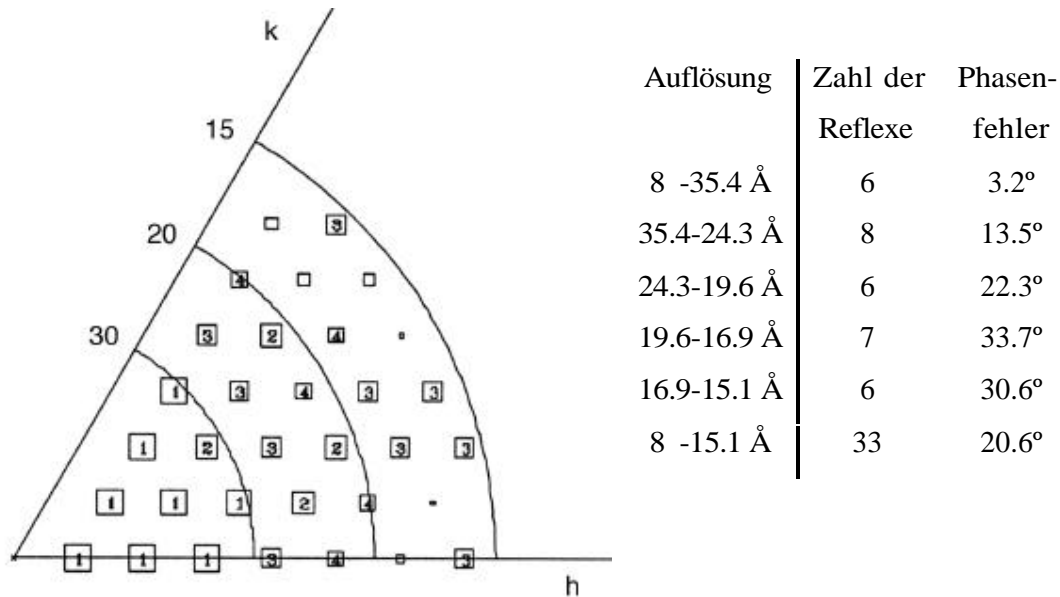


Abb. 27: Graphik der gemittelten Phasenfehler aus den drei verwendeten Bildern. Einem Beugungsreflex zugehöriger Wert ist durch eine Zahl markiert ($1 < 8^\circ$, $2 < 14^\circ$, $3 < 20^\circ$, $4 < 30^\circ$), wobei große Kästchen einen kleinen Fehler bedeuten. Die Ringe markieren die jeweilige Auflösung in Angström. Daneben ist die zugehörige Tabelle dargestellt. Der Phasenfehler von Zufallsdaten würde 90° betragen.

In Abbildung 27 sind die Phasenfehler der gezeigten Projektionskarte abgebildet. Beugungsreflexe bis zur 5. Ordnung weisen noch relativ geringe Phasenfehler auf, dies korrespondiert mit einer Auflösung von 26 Å . Die Darstellung in Tabellenform zeigt, dass der Phasenfehler ab einer Auflösung von 20 Å auf relativ hohem Niveau gleich bleibt. Der gemittelte Phasenfehler aller Reflexe bis 19.6 Å , also bis zur 6. Beugungsordnung, beträgt 13.0° , der Wert für zufällige Phasen würde 90° betragen.

3.4 Auftrennung der Pigmente

Um LHC-II Komplexe mit definierten Pigmentmischungen rückzufalten, war es nötig, die entsprechenden Pigmente aus der Pflanze aufzureinigen. Umgekehrt sollten die in die LHC-II Komplexe eingebauten Pigmente analysiert und quantifiziert werden. Die Pigmente konnten mit Hilfe von Chromatographie durch reversible Adsorption an eine feste Phase nach ihrer

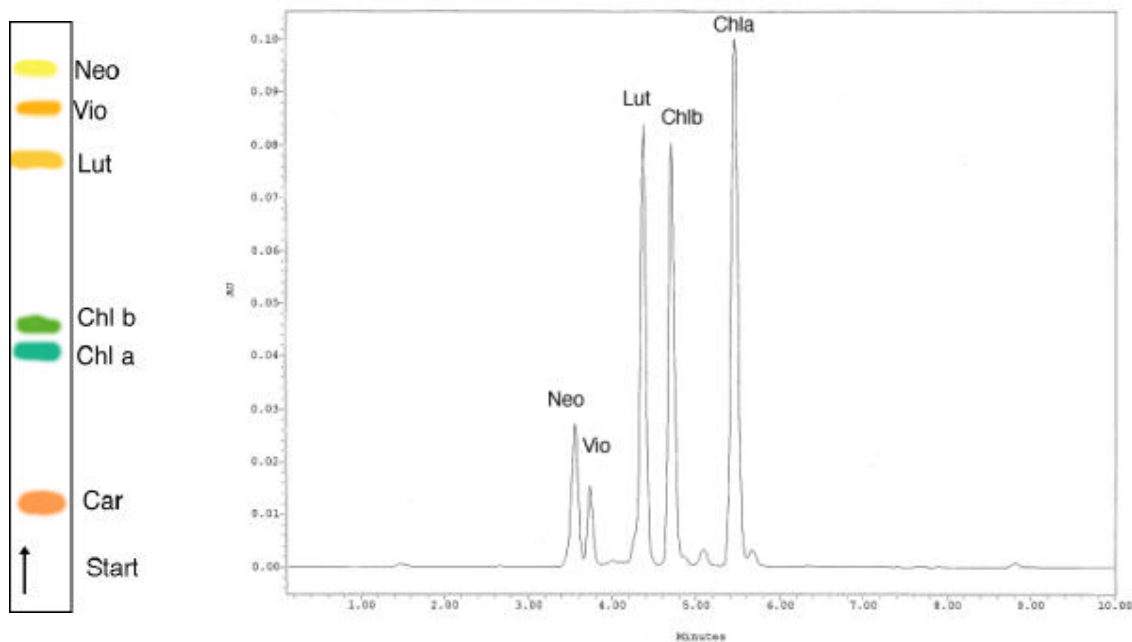


Abb. 28: Links: Replika einer Dünnschichtchromatographie (Kieselgel) von Thylakoidpigmenten. Rechts: HPLC (Umkehrphase, Octadecylsilika) Elutionsprofil von LHC-II Pigmenten, Detektion bei 440 nm. Neo: Neoxanthin, Vio: Violaxanthin, Lut: Lutein, Chl: Chlorophyll, Car: β -Carotin.

Hydrophobizität aufgetrennt werden. In Abbildung 28, links, ist eine Dünnschichtchromatographie gezeigt, welche die Hauptpigmente der Thylakoidmembran auftrennt. Daneben ist das Elutionsprofil einer analytischen Oktadecylsilika-HPLC Säule gezeigt, auf welche nativer LHC-II aufgetragen wurde. Die sehr kleinen Peaks, welche kurz nach Chl *b* und Chl *a* eluieren, stellen die ^{13}C Chlorophyll-Epimere Chl *b'* und Chl *a'* dar (Strukturformeln, siehe Anhang A); sie entstehen durch Epimerisierung der Chlorophylle im Lösungsmittel Aceton nach der Extraktion aus dem LHC-II Komplex. Die Identifikation der Peaks erfolgte mit Hilfe der gleichzeitig aufgenommenen Absorptionsspektren am Diodenarray Detektor der HPLC Anlage. Durch Integration der Peakfläche und den Vergleich zum Auftrag von gereinigten Standards konnte der Pigmentgehalt der Probe bestimmt werden. Hierdurch wurden auch LHC-II Mutanten mit verändertem Pigmentgehalt

identifiziert (siehe Kapitel 3.6). In Tabelle 3 sind die Retentionszeiten einiger Pigmente für die benutzte HPLC Methode (siehe Kapitel 2.11.2) angegeben:

Pigment	Retentionszeit
Neoxanthin	3.55 min
Violaxanthin	3.70 min
Lutein	4.35 min
Zeaxanthin	4.50 min
Chlorophyll <i>b</i>	4.65 min
Chlorophyll <i>a</i>	5.30 min
β-Carotin	8.80 min
Bakteriochlorophyll <i>a</i>	4.55 min
3-Acetyl-Chlorophyll <i>a</i>	4.60 min
3-Vinyl-Bakteriochlorophyll <i>a</i>	5.25 min
Zn- Phäophytin <i>a</i>	5.90 min
Pt-Phäophytin <i>a</i>	7.55 min
Phäophytin <i>a</i>	7.65 min
Ni- Phäophytin <i>a</i>	8.00 min

Tabelle 3: Retentionszeiten von Carotinoiden und Chlorophyll-Derivaten auf einer Umkehrphasen HPLC (C-18 Säule, siehe Kapitel 2.11.2).

Die absoluten Retentionszeiten unterliegen einer gewissen Variation abhängig von der exakten Laufmittelzusammensetzung und der Temperatur. Nachdem sich die Retentionszeiten von Chlorophyll *b* und 3-Acetyl-Chlorophyll *a*, bzw. Chlorophyll *a* und 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll *a* nicht ausreichend unterscheiden, wurden Proben, welche diese Substanzen im Gemisch enthielten, nach einer veränderten Methode wie in Kapitel 2.11.2 beschrieben analysiert.

3.5 Spezifität der Pigmentbindung im LHC-II

3.5.1 Chlorophyll *a* versus Chlorophyll *b* im rekombinanten LHC-II

Um die Bindungsspezifität des LHC-II Komplexes gegenüber Chl *a* oder Chl *b* bei der Rückfaltung zu untersuchen, wurde dieser bei verschiedenen Chl *a/b* Verhältnissen mit Hilfe der Detergenzpräzipitations-Methode gefaltet. Die rückgefalteten Komplexe wurden dann auf einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt.

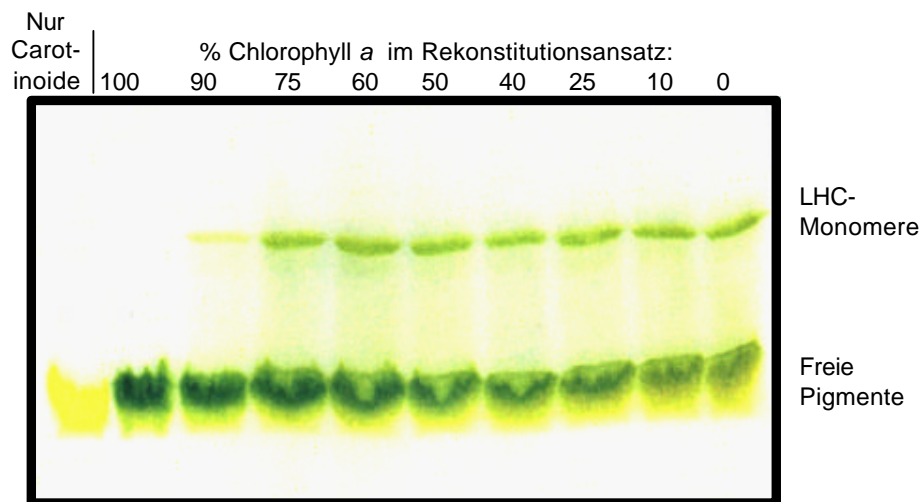


Abb. 29: Nativgel von LHC-II Komplexen, die mit verschiedenen Pigmentmischungen rückgefaltet wurden. Bei den Chlorophyll *a* Variationen waren jeweils immer Chlorophyll *b* und Carotinoide in konstanter Menge vorhanden.

Wie in Abbildung 29 gezeigt, war es nach dieser Methode möglich, LHC-II Komplexe rückzufalten, die kein Chlorophyll *a* enthielten. Eine Faltung ohne Chlorophyll *b* bzw. ganz ohne Chlorophyll nur mit Carotinoiden führte dagegen nicht zu stabilen Komplexen. Eine Untersuchung des Chlorophyllgehalts der LHC-Komplexe in Abhängigkeit des Chl *a/b* Verhältnisses im Rekonstitutionsansatz wurde nicht durchgeführt, da dies zu Überlappung mit den Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppe geführt hätte (Hobe et al., in Vorbereitung).

Bei der weiteren Analyse der nur Chlorophyll *b*-haltigen LHC Monomere zeigte sich, dass diese nach Zugabe von Phosphatidylglycerin und Fällung der Komplexe nicht in der Lage waren, Trimere zu bilden. Jedoch bildeten die so gefalteten Komplexe Trimere, wenn freies Chlorophyll *a* in Gegenwart von 1% Octylglucosid und 10% Ethanol zugegeben wurde. Hierdurch bildeten sich spontan Trimere in der Lösung, welche auf einem schwach

denaturierendem Gel aufgetrennt werden konnten (ohne Abb., vgl. Rogl et al., 1998). Die Ursache für dieses Verhalten lag offenbar darin, dass die LHC Komplexe zwei bis drei Chlorophyllmoleküle durch diese Behandlung austauschten. Dies wurde durch Pigmentanalyse der aus dem schwach denaturierendem Gel ausgeschnittenen Banden nachgewiesen (Abb. 30).

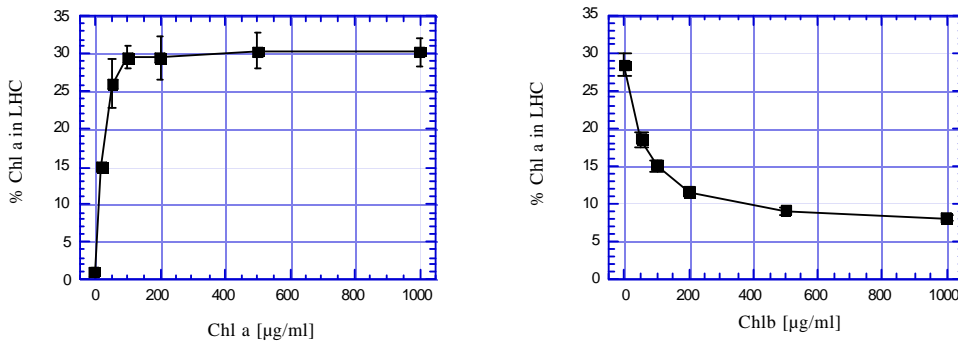


Abb. 30: Chlorophyll Austausch an rekonstituierten LHC-II Monomeren. Links: Zugabe von Chl *a* zu Komplexen, welche nur mit Chl *b* rekonstituiert worden waren. Rechts: Zugabe von Chl *b* zu Komplexen, welche wie links präpariert und anschließend gereinigt wurden. Fehlerbalken: Standardabweichung dreier Experimente.

Gefaltete Chl *b* - LHC-II Komplexe tauschten bis zu 30% ihres Chlorophylls gegen Chl *a* aus, wie in Abbildung 30, links, gezeigt. Da LHC-II Komplexe, welche aus einem grünen Gel isoliert wurden, nur 9-10 Chlorophylle pro zwei Luteine und damit pro Monomer enthielten, entspricht dies ca. 3 Chlorophyllmolekülen. Der Gesamtchlorophyllgehalt aller Komplexe blieb konstant, d.h. es handelte sich in der Tat um den Austausch von Chlorophyllmolekülen und nicht um unspezifische Bindung des zugegebenen Chl *a*. In Abbildung 30, rechts, ist die Reversibilität dieses Vorgangs gezeigt: Hier wurden gereinigte Komplexe, welche durch den oben beschriebenen Versuch mit Chlorophyll *a* versehen worden waren, mit Chlorophyll *b* inkubiert. Es zeigte sich, dass ca. 20% des Chlorophylls, entsprechend ca. 2 Molekülen, zu Chlorophyll *b* rückgetauscht werden konnten. Ca. 10% des Chlorophylls *a* waren jedoch nun so fest gebunden, dass sie nicht mehr ausgetauscht werden konnten. Die Steilheit der Bindungskurve ist in der rechten Abbildung des Versuchs mit Chl *b* deutlich flacher als in der linken, die den Versuch mit Chl *a* beschreibt.

Mit Hilfe eines einfachen Bindungsmodelles (Wyman & Gill, 1990), ließen sich apparente Bindungskonstanten berechnen:

$$X = \frac{n \cdot k \cdot [\text{Chl}]}{1 + k \cdot [\text{Chl}]}$$

wobei X= Anteil des Chl *a* bindenden LHC, n=Anzahl der Bindungsstellen, k=Bindungskonstante, [Chl]=Konzentration des zugegebenen Chlorophylls.

Diese ergaben ungefähre Werte von 5µM für Chlorophyll *a* und 50µM für Chlorophyll *b*. Dies zeigte also eine deutliche Präferenz für Chlorophyll *a* der betroffenen Bindungsstellen. Die Tatsache, dass eine Bindungsstelle im Versuch überhaupt nicht mehr gegen Chlorophyll *b* austauschte, sobald sie einmal mit Chlorophyll *a* besetzt wurde, passt gut in diesen Zusammenhang.

Diese Bindungsstellen sollten dementsprechend im nativen LHC-II Komplex mit Chlorophyll *a* besetzt sein, welches die höhere Bindungskonstante aufweist. Nativer LHC-II zeigte in diesem System bei Inkubation mit Chlorophyll *b* den Austausch von ca. 3-4 Molekülen Chl *a* gegen Chl *b*, während bei der Inkubation mit Chlorophyll *a* weniger als ein Molekül Chl *b* gegen Chl *a* getauscht wurde (ohne Abbildung). Dieses Verhalten ist im folgenden Abschnitt weiter dargestellt, wobei dort die Isolierung der Komplexe statt auf Polyacrylamidgelen durch Ionenaustauschchromatographie durchgeführt wurde.

3.5.2 Chlorophyllaustausch am nativen LHC-II mit Chlorophyllderivaten

Ein modifiziertes Chlorophyllaustausch-Protokoll wurde angewendet, um für spektroskopische Untersuchungen Komplexe in genügender Menge herzustellen. Es wurde nativer, pflanzlicher LHC-II mit Chlorophyllderivaten (siehe Tabelle X) in Gegenwart von 1% Octylglucosid inkubiert, so dass einige der LHC-II Chlorophylle gegen das im Überschuss angebotene Chlorophyllderivat ausgetauscht wurden. Die so erhaltenen Komplexe wurden dann durch Ionenaustauschchromatographie von den nicht gebundenen Pigmenten abgetrennt. Ein Ziel war hierbei u.a. die Generierung von Schwermetallderivaten für die Röntgenkristallographie durch die Verwendung eines Chlorophyllderivats mit einem Schwermetall als Zentralatom. Da die austauschbaren Bindungsstellen im nativen LHC-II Chlorophyll *a* binden, wurde auch der Austausch mit modifiziertem Chlorophyll *a* versucht, welches andere Zentralionen im Porphyrinring enthält. Die Nomenklatur bezeichnet ein Chlorophyllgerüst, welches Zn^{++} statt Mg^{++} als Zentralatom enthält, als Zn-Phäophytin, Chlorophyll kann demnach auch als Mg-Phäophytin bezeichnet werden (Strukturformel, siehe Anhang A). Erstaunlicherweise konnte nur eine der getesteten Spezies, nämlich

Zn-Phäophytin, ausgetauscht werden. Derivate mit Modifikationen der Porphyrinringseitenketten wurden jedoch bereitwilliger eingebaut, so dass insgesamt ein Austausch mit Zn-Phäophytin, Chlorophyll *b*, 3-Acetyl-Chlorophyll und 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll möglich war (Tabelle 4). Die getesteten Chlorophylle unterscheiden sich auch spektroskopisch deutlich: Der Austausch des zentralen Magnesiums im Chlorophyll gegen Zink, Nickel oder Platin führt zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Verschiebung des langwelligen Q_y Absorptionspeaks zu kürzeren Wellenlängen (Tabelle 4). Chlorophyll *b* zeigt durch die Oxidation des 7-Methylrestes zu Formyl eine Blauverschiebung der Q_y Bande. Bakteriochlorophyll hat durch den höheren Reduktionszustand des Porphyringerüsts die Absorption ins Infrarote verschoben. 3-Acetyl-Chlorophyll trägt an der 3 Position die Seitenkette des Bakteriochlorophylls, während 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll dort die Seitenkette des pflanzlichen Chlorophylls trägt, jedoch das Bakteriochloringerüst aufweist. Die Absorptionsmaxima dieser beiden Derivate liegen zwischen denen des Chlorophylls und des Bakteriochlorophylls.

Chlorophyll-Derivat	Absorptionspeak (nm) in Diethylether		Austausch im LHC-II
Chlorophyll <i>a</i>	428 ^{a,b}	660 ^{a,b}	
Phäophytin <i>a</i>	409 ^a	667 ^a	-
Zn- Phäophytin <i>a</i>	424 ^b	653 ^b	+
Ni- Phäophytin <i>a</i>	418 ^b	647 ^b	-
Pt- Phäophytin <i>a</i>	405 ^b	633 ^b	-
Chlorophyll <i>b</i>	452 ^a	642 ^a	+
3-Acetyl- Chlorophyll <i>a</i>	433 ^b	675 ^b	+
3-Vinyl-Bakteriochlorophyll <i>a</i>	349 ^b	744 ^b	+
Bakteriochlorophyll <i>a</i>	357 ^b	770 ^b	-

Tabelle 4: Chlorophyll-Derivate, welche im Chlorophyll-Austausch-Versuch mit nativem LHC-II verwendet wurden. Die Absorptionsmaxima in Diethylether sind angegeben. ^a Lichtenthaler, 1987; ^b experimentell bestimmt.

In Abbildung 31 sind die Tieftemperatur-Absorptionsspektren der ausgetauschten LHC Komplexe bei 77K gezeigt, als Referenz diente jeweils nativer LHC, welcher dem gleichen experimentellen Prozedere unterworfen wurde, jedoch ohne die Zugabe von Chlorophyll. Die Peaks der Chlorophyll *a* Region bei 661nm, 670nm und 676nm waren in ihrer Absorption verringert, dafür ergaben die eingebauten Chlorophyll-Derivate neue spektrale Absorption.

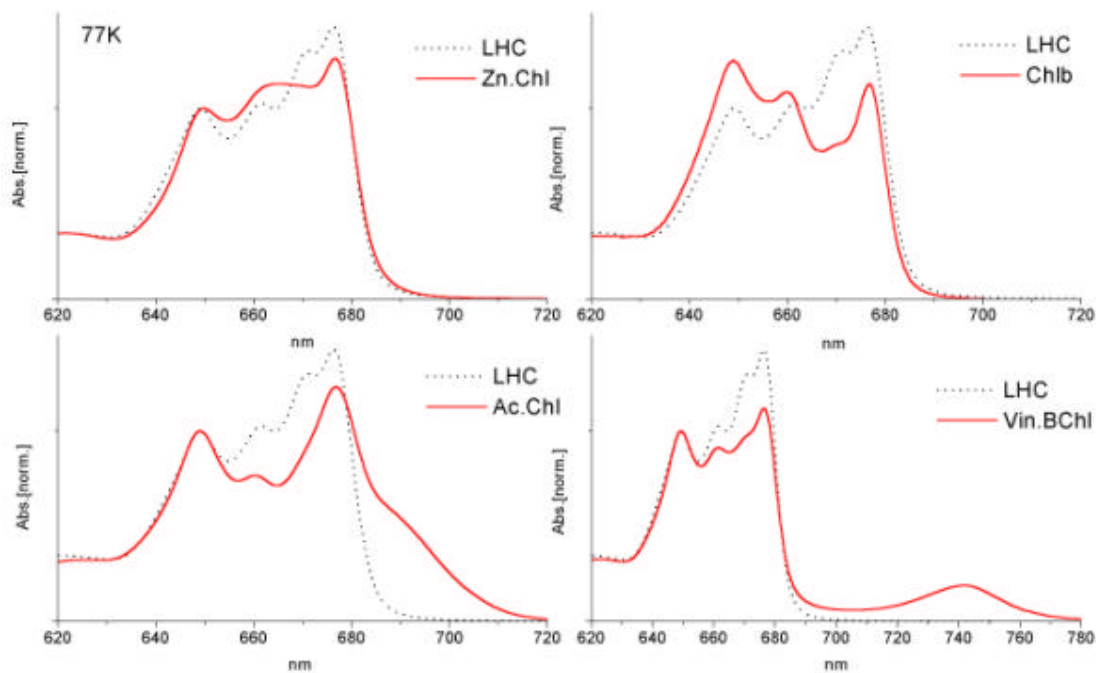


Abb. 31: Normalisierte Tieftemperatur-Absorptionsspektren von LHC-II Komplexen mit ausgetauschten Chlorophyllen. Austausch mit Zn-Phäophytin *a* (Zn.Chl), Chlorophyll *b* (Chlb), Acetyl-Chlorophyll *a* (Ac.Chl) und Vinyl-Bakteriochlorophyll *a* (Vin.BChl). Kontrolle: nativer LHC ohne ausgetauschtes Chl (LHC).

Diese war beim Zn-Phäophytin (oben links) mit der Absorption des LHC-II Komplexes überlagert, jedoch liegt der Bereich ungefähr bei 665nm. Beim Austausch gegen Chlorophyll *b* fiel auf (oben rechts), dass die Bande bei 670nm am stärksten erniedrigt ist. Neue Absorption ergab sich sowohl bei 650nm als auch bei 661nm. Dies läßt darauf schließen, dass der spektrale Bereich bei 661nm nicht nur von Chlorophyll *a*, sondern auch von Chlorophyll *b* gebildet wird. Beim 3-Acetyl-Chlorophyll zeigte sich die neue Absorption jenseits des langwelligsten LHC-II Chlorophylls bei ca. 690nm (unten links), reduziert waren vor allem die Bereiche bei 661nm und 670nm. 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll (unten rechts) stellte mit seiner Absorption der Q_y Bande im Infraroten die langwelligste Spezies dar, welche deutlich von der restlichen LHC Absorption abgegrenzt werden konnte. Im LHC Komplex war hier die gesamte Chlorophyll *a* Region erniedrigt, jedoch waren die Peaks bei 670 und 676nm am stärksten betroffen. Beim 3-Acetyl-Chlorophyll und beim 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll fiel die vergleichsweise große Breite der neu aquirierten Banden auf, welche im letzteren Fall eine Halbwertsbreite (fwhm=full width at half maximum) von 34nm bei der gemessenen Temperatur von 77K beträgt. Dies stellt jedoch eine intrinsische Eigenschaft dieser Derivate dar und hat nichts mit der Bindung im Komplex zu tun, da auch

deren Halbwertsbreiten in Diethylether entsprechend größer sind. Die Werte betrugen bei Raumtemperatur 17nm für Chl *a*, 17nm für Chl *b*, 18nm für Zn-Phäo *a*, 27nm für 3-Acetyl-Chl *a*, 32nm für BChl *a* und 32nm für 3-Vinyl-BChl *a*.

In Tabelle 5 sind die HPLC Analysen der ausgetauschten LHC-II Komplexe gezeigt. Als interne Referenz wurden zwei Lutein Moleküle pro Komplex angenommen.

Probe	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i>	Chl Derivat	? Chl
LHC (4)	5.7 ± 0.07	6.4 ± 0.07	0	12.1
Zn-Phäo (2)	5.1 ± 0.17	3.9 ± 0.21	3.5 ± 0.32	12.8
Chl <i>b</i> (2)	10.6 ± 1.0	5.2 ± 0.05	? 4.9	15.8
Acetyl-Chl (2)	7.3 ± 0.11	3.9 ± 0.10	1.9 ± 0.02	13.2
Vinyl-BChl (2)	5.9 ± 0.32	5.1 ± 0.32	0.53 ± 0.02	12.1

Tabelle 5: HPLC Analyse der ausgetauschten LHC-II Komplexe. Es sind jeweils die eingetauschten Chlorophyllderivate angegeben und in Klammern die Anzahl unabhängig durchgeführter Experimente. Beim Chl *b* ist der Unterschied zu nativem LHC angegeben (?). LHC=Referenzexperiment.

Im Falle des Zn-Phäophytins ergab sich ein Austausch von ca. 3 Chlorophyll *a* Molekülen, sowohl der Gesamtchlorophyllgehalt als auch der Chlorophyll *b* Anteil blieben nahezu unverändert. Beim Experiment mit dem Chlorophyll *b* Tausch deuten die HPLC Daten auf den spezifischen Austausch von 1-2 Molekülen hin während 3-4 Moleküle Chlorophyll *b* unspezifisch gebunden wurden und hierdurch den Gesamtchlorophyllgehalt des Komplexes erhöhten. Da Chlorophyll *b* durch die zusätzliche Formylgruppe die Hydrophilität des Porphyrinringes erhöht hat, ist möglicherweise die Detergenzeigenschaft des Chlorophyll *b* Moleküls mit hydrophilem Kopf und hydrophoben Phytolschwanz für dieses Phänomen verantwortlich. In dem Versuch mit 3-Acetyl-Chlorophyll wurden ca. 2 Chlorophyllmoleküle ausgetauscht. Der unerwartet erhöhte Chl *b* Gehalt deutet eventuell auf ein Abbauprodukt des Acetyl-Chlorophylls hin, welches im HPLC Lauf nicht vom Chl *b* unterschieden werden konnte. 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll wurde laut HPLC Analyse mit weniger als einem Molekül eingebaut. Da jedoch die spektroskopischen Daten klar auf einen spezifischen Einbau hinweisen, reflektiert dieser geringe Wert eventuell eine Ungenauigkeit des zur Quantifizierung verwendeten Extinktionskoeffizienten oder der HPLC Analysenmethode für dieses Derivat.

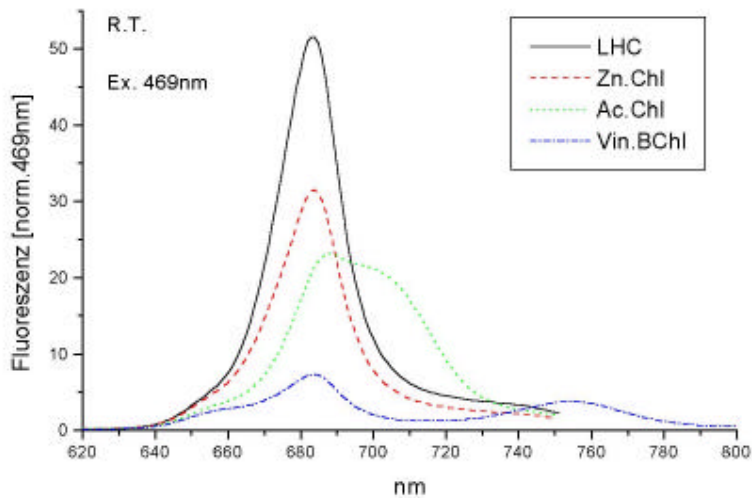


Abb. 32: Normalisierte Fluoreszenz-Emissionsspektren von LHC-II mit eingebauten Chlorophyll-Derivaten. Anregung von Chl *b* bei 469nm. Abkürzungen wie in Abb. 31

Durch Fluoreszenzspektroskopie sollte untersucht werden, inwieweit die Energieübertragung im LHC-II Komplex beeinträchtigt wurde. Es wurde der Soret-Bereich des Chlorophyll *b* bei 469nm angeregt, im nativem LHC wird dann die gesamte Anregungsenergie auf den roten Chlorophyll *a* Bereich übertragen, so dass eine Emission bei 680nm gemessen werden kann. Bei nicht funktionierendem Transfer emittiert Chlorophyll *b* bei 655nm oder die Anregung kann auch strahlungslos gelöscht werden. Die Spektren in Abbildung 32 und 33 wurden deshalb auf die optische Absorption bei der Anregungswellenlänge normalisiert.

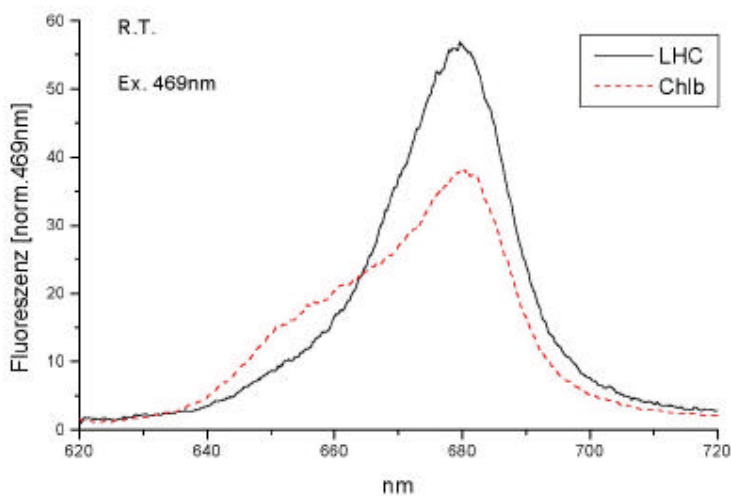


Abb. 33: Normalisiertes Fluoreszenz-Emissionsspektren von LHC-II mit zusätzlich eingebautem Chlorophyll *b* (Chl *b*). Referenz: nativer LHC-II (LHC). Anregung von Chl *b* bei 469nm.

Die Spektren von der mit Chlorophyll *b* ausgetauschten Probe sind extra dargestellt (Abb. 33), da diese an einem anderen Gerät aufgenommen wurden.

Bei den langwelligeren Chlorophyllderivaten ist klar erkennbar, dass Energie auch von diesen emittiert wird. Es zeigten sich dementsprechend zusätzliche Emissionspeaks bei ca. 700nm für 3-Acetyl-Chl und 755nm für 3-Vinyl-BChl. Dies bedeutet, dass die Energie vom angeregten Chlorophyll *b* auf die neu eingebauten Chlorophyllspezies übertragen wurde. Die geringere Höhe der Emissionspeaks auch bei Zn-Phäophytin deutet auf eine gestörte Energieübertragung in diesen Komplexen hin, welche zu einem gewissen Anteil an Löschung der Anregungsenergie führte. Dieses Phänomen war auch bei den Chlorophyll *b* ausgetauschten Komplexen beobachtbar. Außerdem führten hier die zusätzlichen, unspezifisch gebundenen Chlorophyll *b* Moleküle zu Emission auch im Chlorophyll *b* Bereich bei 655nm. Die 3-Vinyl-BChl ausgetauschte Probe hatte das am stärksten veränderte Spektrum: auch hier war ein gewisser Anteil an Chlorophyll *b* Emission erkennbar. Insgesamt zeigte diese Probe die stärkste Löschung der Anregungsenergie und damit auch die geringsten Peakhöhen; dies wurde an mehreren unabhängig hergestellten Proben verifiziert. Trotzdem wurde Energie bis auf das gebunden 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll übertragen; in einem Kontrollversuch, in dem nativer LHC-II in Dodecylmaltosid mit freiem 3-Vinyl-BChl vermischt wurde, fand keine Energieübertragung auf das Chlorophyll-Derivat statt.

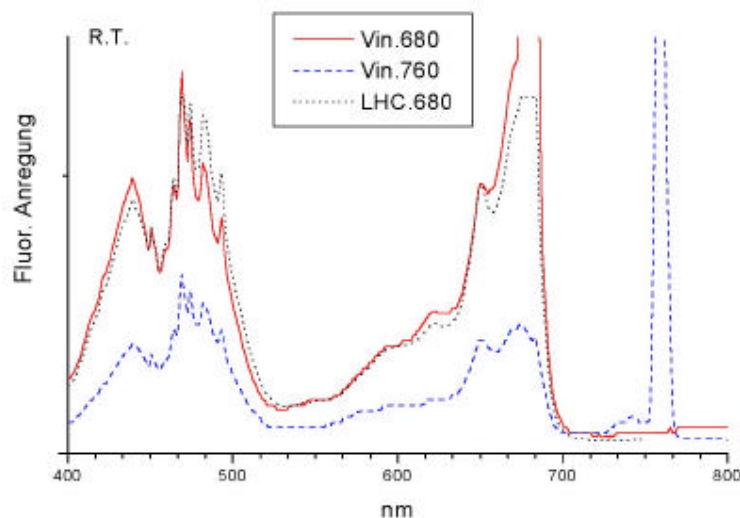


Abb. 34: Fluoreszenz-Anregungsspektrum von LHC-II mit eingetauschem Vinyl-Bakteriochlorophyll *a* (Vin.). Detektion bei 680nm (entspricht Chl *a*) oder 760 nm (entspricht Vinyl-BChl *a*). Kontrolle: Nativer LHC, detektiert bei 680nm (LHC.).

Bei einem Fluoreszenzanregungsspektrum wird ermittelt, von welchen Anregungswellenlängen Energie auf die Detektionswellenlänge übertragen wird. Führt man diesen Versuch mit nativem LHC-II durch und detektiert bei 680nm (Abb. 34), erhält man im Prinzip das Absorptionsspektrum des Komplexes, da alle absorbierenden Spezies gleichermaßen gut die Energie auf das emittierende Chlorophyll bei 680nm übertragen. Bei dem dominierenden Peak nahe der Detektionswellenlänge handelt es sich um einen Ramanpeak, der nichts mit der physiologischen Energieübertragung zu tun hat. Führt man den Versuch nun mit Vinyl-Chlorophyll ausgetauschtem LHC-II durch, zeigte sich ein identisches Ergebnis, welches auch die Feinstruktur im Soretbereich reproduzierte. Um festzustellen, ob auch alle Pigmente Energie auf das ausgetauschte Chlorophyll übertragen können, wurde die Detektionswellenlänge auf die Emission des 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll gestellt. Auch hier wurde ein LHC Spektrum beobachtet, was auf eine gute energetische Kopplung des eingebauten Pigments hinweist.

Wie oben gezeigt, konnte Ni-Phäophytin *a* nicht in den LHC Komplex eingebaut werden. Dieses Pigment ist jedoch besonders interessant, da es als Quencher wirkt, und die Anregungsenergie strahlungslos in Wärme umwandelt. In einem Fluoreszenzexperiment findet man entsprechend keine Emission dieses Derivates in Lösung. Deshalb wurde der Einbau schon während der Faltung in einem Säulenfaltungs-Experiment versucht, in einem Standardrekonstitutionsansatz war der Chlorophyll *a* Anteil mit 8% bzw. 25% Ni-Phäophytin *a* versehen. In beiden Fällen konnte jedoch kein Einbau in den LHC-II Komplex detektiert werden.

3.5.3 *LHC-II mit nur einer Carotinoidspezies*

In aus Erbsen isoliertem LHC-II findet man drei verschiedene Carotinoide, nämlich Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin (Strukturformeln, siehe Anhang A). Im folgende Versuch sollte untersucht werden, ob LHC Komplexe auch mit nur einer Carotinoidspezies rückgefaltet werden können. Die Komplexe wurden nach der Säulenfaltungsmethode gefaltet und trimerisiert, das Chlorophyll *a/b* Verhältnis wurde konstant gehalten. Wie aus Abbildung 35 ersichtlich, führt jedes der getesteten Carotinoide zu stabilen Monomeren. Trimere Komplexe konnten nur mit Lutein oder Violaxanthin gebildet werden, wobei die Ausbeute mit Violaxanthin geringer als bei Lutein oder der Kontrolle ausfällt.

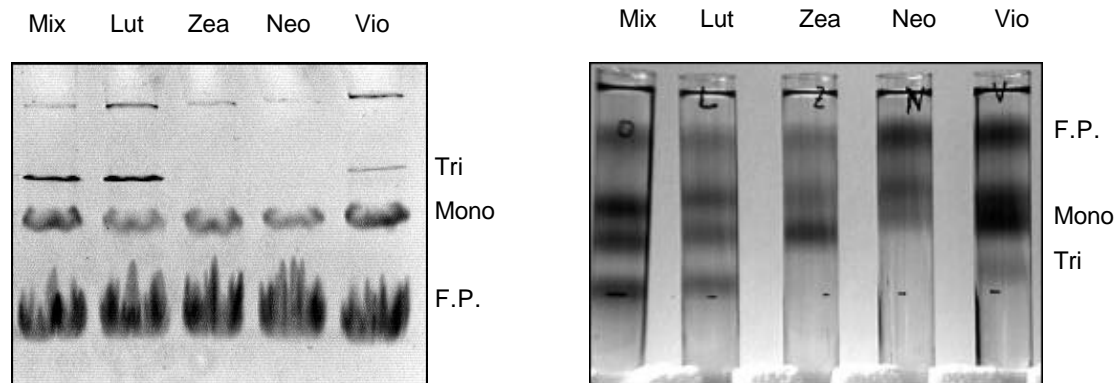


Abb. 35: Rückfaltung von LHC-II mit nur einer Carotinidspezies. Links: Nativgel. Rechts: Nach Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation. Mix: Kontrolle mit allen Carotinoiden, Lut: Lutein, Zea: Zeaxanthin, Neo: Neoxanthin, Vio: Violaxanthin; F.P.: Freie Pigmente, Mono: Monomere, Tri: Trimere.

In Tabelle 6 ist die Pigmentzusammensetzung der Banden vom Saccharose-Dichtegradienten gezeigt. Die Werte wurden auf 7 Chlorophyll *a* Moleküle normalisiert, um vor allem die relativen Unterschiede zu betrachten, die exakten Absolutwerte sind deshalb vom Chl *a* Gehalt abhängig. Da sich die Chl *a/b* Verhältnisse der Einzelxanthophyll-Komplexe aber nur wenig von denen unterscheiden, welche mit einem Carotinoidmix rückgefaltet wurden, lässt dies auf eine korrekte Faltung der Komplexe schließen. Obwohl nur mit einer Carotinidspezies rückgefaltet wurde, finden sich teilweise auch geringe Anteile der anderen Carotinoide in den LHC Komplexen, da bereits kleinste Verunreinigungen im verwendeten Carotinoid durch die vorhandenen Bindungsspezifitäten im LHC selektiv angereichert werden. Die mit Lutein oder Violaxanthin rückgefalteten Trimere zeigen den höchsten Xanthophyllgehalt. Diese Carotinoide können offenbar sehr gut auch in die anderen Bindungsstellen eingebaut werden, so dass die entsprechenden Trimere ca. 3 Carotinoide gebunden haben. Die zugehörigen Monomere zeigen diese Eigenschaft in deutlich geringerem Maße, sie haben nur ca. 2 Carotinoide gebunden. Die geringere Bindungskapazität der auf den Saccharosegradienten isolierten Monomere äußert sich auch in einem höheren Chl *a/b* Verhältnis, welches auf den unspezifischen Verlust von Chl *b* zurückzuführen ist. Die mit nur einem Carotinoid gefalteten Monomere zeigen eine geringere Erhöhung des Chl *a/b* Verhältnisses als der Wildtyp. Neoxanthin ist am wenigsten in der Lage, die anderen Carotinoide zu ersetzen: dies zeigt sich an der starken Anreicherung dieser Carotinoide, welche im Faltungsansatz nur in Spuren (<4%) vorhanden waren.

<i>Probe vom SDG</i>	<i>Neoxanthin</i>	<i>Violaxanthin</i>	<i>Lutein</i>	<i>Zeaxanthin</i>	<i>Chl a/b</i>
Mix, Tri	0.78±0.05	0.41±0.02	1.68±0.04	0	1.12±0.05
Mix, Mono	0.53±0.06	0.60±0.17	1.61±0.22	0	1.54±0.16
Lut, Tri	0	0	2.83±0.13	0	1.17±0.03
Lut, Mono	0	0	2.21±0.22	0	1.44±0.04
Zea, Mono	0	0	0.07±0.09	1.73±0.05	1.36±0.05
Neo, Mono	1.96±0.32	0.29±0.18	0.12±0.03	0	1.31±0.02
Vio, Tri	0.01±0.01	2.79±0.21	0.09±0.01	0	1.13±0.03
Vio, Mono	0	2.28±0.26	0.15±0.10	0	1.35±0.01

Tabelle 6: Pigmentzusammensetzung von LHC-II, welcher nur mit einer Carotinoidspezies rückgefaltet wurde. HPLC- Analyse der Banden vom Saccharose-Dichtegradienten, Standardabweichung dreier unabhängiger Versuche. Für die Carotinoidbestimmung wurden 7 Chlorophyll *a* Moleküle pro LHC Monomer angenommen.

Tabelle 7 zeigt die HPLC Daten der Banden, die aus dem grünen Gel ausgeschnitten wurden. Durch Kontamination der benachbarten Gelspuren zeigen sich hier etwas höhere Anteile von verunreinigenden Carotinoiden. Insgesamt bestätigen die Daten diejenigen aus den Saccharosegradienten.

<i>Probe vom Gel</i>	<i>Neoxanthin</i>	<i>Violaxanthin</i>	<i>Lutein</i>	<i>Zeaxanthin</i>	<i>Chl a/b</i>
Mix, Tri	0.87±0.05	0.42±0.05	1.99±0.11	0	1.12±0.05
Mix, Mono	1.00±0.08	0.52±0.04	1.91±0.17	0	1.02±0.07
Lut, Tri	0.08±0.14	0.06±0.11	3.43±0.25	0	1.04±0.03
Lut, Mono	0.17±0.28	0.09±0.15	3.08±0.38	0	0.98±0.07
Zea, Mono	0.06±0.03	0.01±0.01	0.21±0.12	2.93±0.29	0.97±0.13
Neo, Mono	2.08±0.28	0.32±0.13	0.18±0.06	0	0.92±0.06
Vio, Tri	0	3.14±0.23	0.09±0.03	0	0.98±0.04
Vio, Mono	0.03±0.06	2.96±0.34	0.15±0.08	0	0.98±0.06

Tabelle 7: Pigmentzusammensetzung von LHC-II, welcher nur mit einer Carotinoidspezies zurückgefaltet wurde. HPLC- Analyse der Banden aus einem Nativgel, Standardabweichung dreier unabhängiger Versuche. Für die Carotinoidbestimmung wurden 7 Chlorophyll *a* Moleküle pro LHC Monomer angenommen.

Die Monomere der Lutein-, Zeaxanthin- und Violaxanthinkomplexe binden hier drei Xantophylle, obwohl sie bei Isolation über Saccharose-Dichtegradient nur ca. zwei gebunden

hatten. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass nur die stabilsten Monomere, welche drei Carotinoide gebunden haben, bei der Auftrennung auf dem Gel erhalten bleiben.

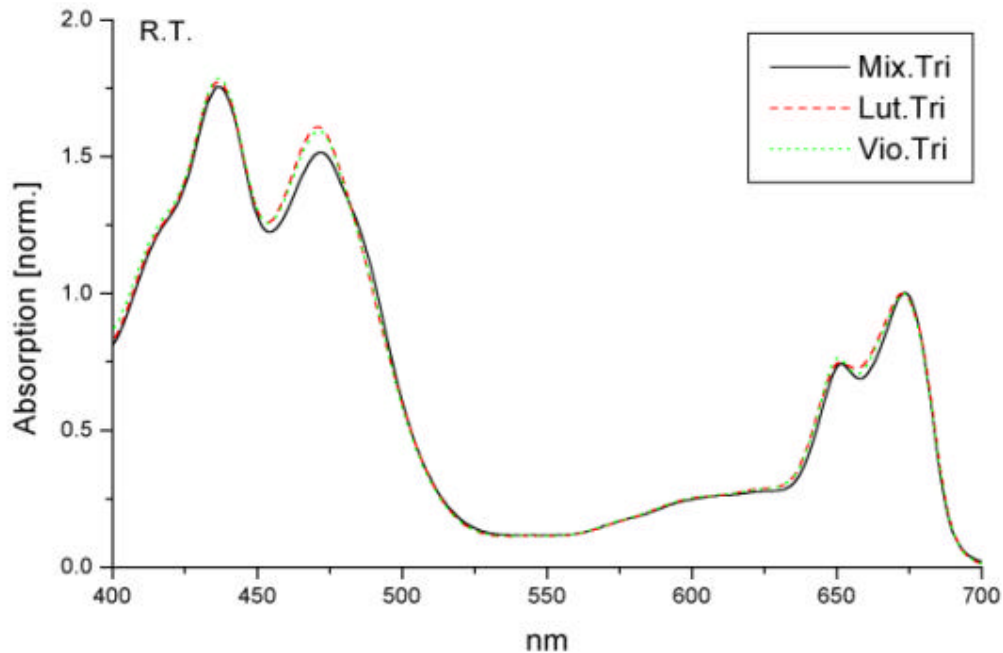


Abb. 36: Raumtemperatur-Absorptionsspektren von trimeren LHC-II Komplexen, die nur mit einer Carotinoide spezie rückgefaltet wurden. Mix: Carotinoide Mischung, Lut: nur Lutein, Vio: nur Violaxanthin. Chl *a/b* Verhältnis der hier verwendeten Proben: Mix: 1.16, Lut: 1.17, Vio: 1.11.

In Abbildung 36 sind die Absorptionsspektren der trimeren Einzelcarotinoidekomplexe bei Raumtemperatur gezeigt. Insgesamt sind nur kleine Veränderungen im Vergleich zu den Komplexen sichtbar, welche mit einer Carotinoide Mischung rückgefaltet wurden: Die Schulter bei 485 nm ist bei den Trimeren, die nur mit Lutein oder Violaxanthin gefaltet wurden, leicht erniedrig, dafür ist der Absorptionsspitzen bei 470 nm erhöht. Interessanterweise findet man auch kleine Änderung im Q_y Bereich der Chlorophyllabsorption die nicht von Carotinoideabsorption überlagert wird: Sowohl der Chlorophyll *a* als auch der Chlorophyll *b* Peak zeigen eine Verbreiterung in der kürzerwelligen Flanke. Diese kleinen Änderungen sind durch die Fehlbesetzung der Carotinoidebindungsstellen bedingt, welche sich indirekt über die Proteinkonformation oder durch Änderungen der unmittelbaren Umgebung der Chlorophylle auf deren spektrale Eigenschaften niederschlagen.

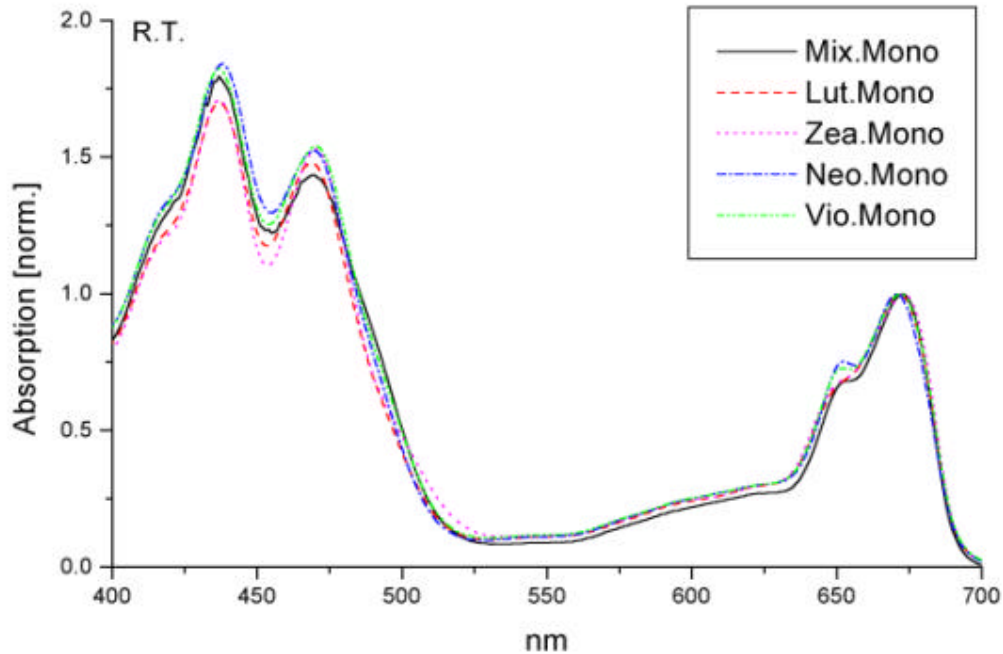


Abb. 37: Raumtemperatur-Absorptionsspektren von monomeren LHC-II Komplexen, die nur mit einer Carotinoidepezies rückgefaltet wurden. Mix: Carotinoidmischung, Lut: nur Lutein, Zea: nur Zeaxanthin, Neo: nur Neoxanthin, Vio: nur Violaxanthin. Chl *a/b* Verhältnis der hier verwendeten Proben: Mix: 1.45, Lut: 1.45, Zea: 1.34, Neo: 1.32, Vio: 1.34.

Der auffälligste Unterschied der mit nur einem Carotinoid gefalteten Monomere (Abb. 37) liegt erstaunlicherweise im Q_y Bereich des Chlorophylls *b* bei 650nm. Dieser ist normalerweise bei monomeren Komplexen, die von einem Saccharosegradienten isoliert wurden, erniedrigt, da diese ein höheres Chl *a/b* Verhältnis aufweisen. Bei den Monomeren mit nur Neoxanthin und Violaxanthin ist dies jedoch nicht der Fall, die Chl *b* Q_y Schulter ist deutlich ausgeprägt wie bei den trimeren Komplexen, trotz des erhöhten Chl *a/b* Verhältnisses. Wie bei den trimeren Einzelcarotinoidkomplexen, findet man auch hier eine Verbreiterung der kurzwelligen Flanken des Q_y Chlorophyllbereiches. Bei den Neoxanthinkomplexen ist der gesamte rote Absorptionsgipfel um 1nm ins Blaue verschoben. Im Soret-Bereich ist vor allem bei den Komplexen mit Lutein und Zeaxanthin die Schulter bei 485nm zu Gunsten des 470nm Absorptionspeaks deutlich erniedrigt. Komplexe mit Neoxanthin oder Violaxanthin kommen dem Wildtyp in diesem Bereich am nächsten. Der untere Bereich der Absorptionsschulter bei 500-525nm der Zeaxanthinproben ist von allen Komplexen am langwelligsten. Er ist wahrscheinlich auf die Absorption des Zeaxanthins zurückzuführen, da dieses auch frei in Lösung die langwelligste Absorption im Vergleich zu den anderen Carotinoiden zeigt.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass Neoxanthin und Violaxanthin in der Lage sind, die Q_y Absorption des Chl *b* zu modulieren. Da die Absorptionsschulter bei 485nm das gleiche Modulationsverhalten zeigt, ist diese wahrscheinlich auch dem Chlorophyll *b* zuzuordnen, und nicht durch die Absorption der Carotinoide direkt verursacht.

3.5.4 LHC-II Trimere ohne Chlorophyll *a*

Wurde LHC-II ohne Chlorophyll *a* rückgefaltet, so konnten nach Verwendung der Dialysemethode keine Trimere gebildet werden. Bei Verwendung der Säulentrimerisierung bildeten jedoch auch diese Komplexe Trimere (Abb. 38). Diese konnten nicht nur durch Zentrifugation auf einem Saccharose-Dichtegradienten isoliert werden, sondern zeigten auch in einem Nativgel stabile Trimerbanden (ohne Abb.).

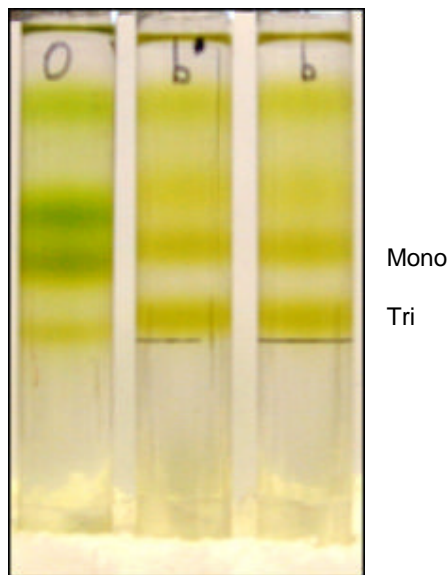


Abb. 38: Saccharose-Dichtegradienten von LHC-II, welcher mit Pigmentmischung (0), mit einem Chl *a/b* = 0.03 (*b'*) und mit Chl *a/b* = 0 (*b*) rückgefaltet wurde. Tri: Trimer, Mono: Monomer.

Die HPLC Analysen der Proben ergaben, dass diese kein Chlorophyll *a* enthalten, wobei das Detektionslimit bei ca. 0.03 Molekülen pro Monomer lag. Wurden zwei Luteinmoleküle als Standard angenommen, ergaben sich 14 gebundene Chlorophyll *b* Moleküle pro Monomer. Daraus lässt sich ableiten, dass auch in diesem Komplexen alle Chlorophyllbindungsstellen besetzt sind, jedoch nur durch Chlorophyll *b*. Als Referenz zu einem in der Literatur beschriebenen Experiment (Kleima et al., 1999), wurde auch eine Probe mit einem geringen Chl *a/b* Verhältnis rückgefaltet, das jedoch größer als Null war: Die resultierenden Trimere hatten laut HPLC Analyse 0.5 Moleküle Chl *a* pro Monomer eingebaut, und verhielten sich biochemisch identisch zu den anderen Komplexen.

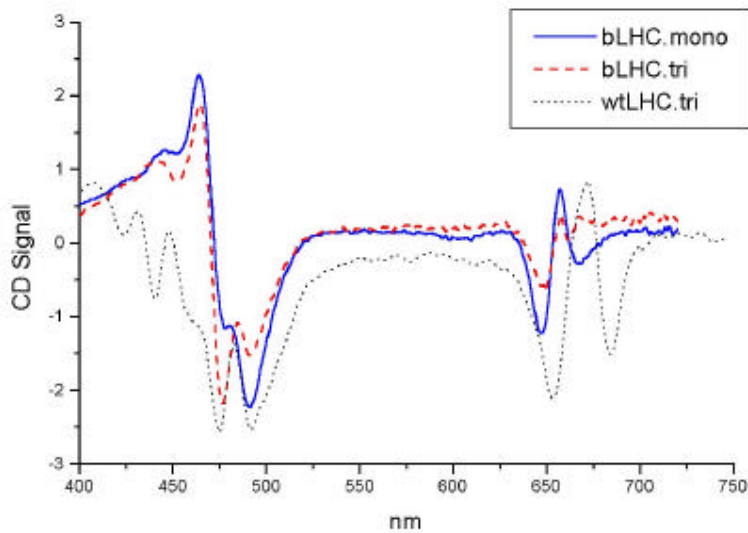


Abb. 39: CD Spektrum der LHC Monomere und Trimere bei Raumtemperatur, welche nur mit Chl *b* rückgefaltet wurden (bLHC). Referenz: Rekombinante Trimere mit Chl *a* und Chl *b* (wtLHC.tri).

Im CD Spektrum der nur Chl *b* haltigen Trimere (Abb. 39) erkennt man bei 477nm den Trimer-spezifischen, negativen Peak, der für nativen LHC-II bekannt ist (Hobe, 1995a), und bei Monomeren abwesend ist (vgl. Abb. 20). Die Komplexe, die nur mit Chlorophyll *b* rückgefaltet wurden, zeigen hier gleiches spektrales Verhalten wie diejenigen, die Chl *a* und Chl *b* enthalten. Damit ist gezeigt, dass dieser Peak durch Chl *b* und/oder Xanthophylle, und nicht durch Chl *a* verursacht ist. Ein Unterschied im Soret-Bereich ergibt sich durch ein Maximum der Chl *b* Komplexe bei 464nm, die Komplexe mit Chl *a* und Chl *b* haben hier negatives CD Signal. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Daten von Hobe (1995a), eine Zusammenfassung der Literaturwerte der LHC-II CD-Banden wird im Anhang D gegeben.

Im Q_y Bereich findet man zwei negative CD Banden, die für die Chl *b* Trimere bei 648nm und 662nm ihre Minima besitzen, während die Werte bei den Chl *b* Monomeren bei 647nm und 667nm betragen. Das Minimum bei 648nm ist im Vergleich zu den Chl *a/b* Trimeren (Minimum bei 653nm) 5nm ins Kürzerwellige verschoben. Die Bande bei 662nm bzw. 667nm hat keine Entsprechung im Chl *a/b* LHC-II. Dieser besitzt eine weitere, negative Bande bei 684nm, welche dem Chl *a* zugeschrieben wird.

Ein Raumtemperaturabsorptionsspektrum der LHC Trimere, welche ausschließlich Chl *b* und Carotinoide enthielten, ergab einen deutlich verbreiterten Q_y Peak bei 655nm (ohne Abb.). Dieser konnte bei 77K in zwei Peaks bei 648 und 655nm aufgelöst werden (Abb. 40). Außerdem ist im spektralen Chlorophyll *a* Bereich eine tiefe Schulter erkennbar, welche sich bis zu 680nm erstreckt, obwohl in der Probe kein Chl *a* vorhanden ist.

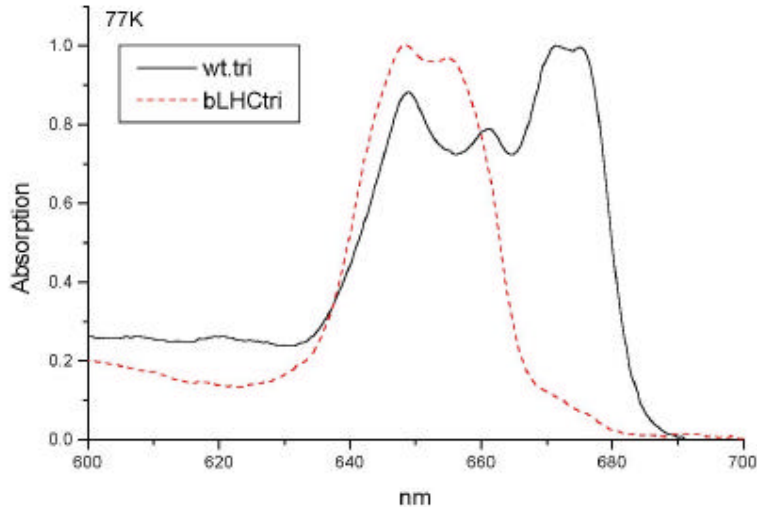


Abb. 40: Tieftemperatur-Absorptionsspektrum von rückgefaltetem LHC-II (wt.tri) und ohne Chl *a* rückgefaltetem LHC-II (bLHCtri), jeweils trimere Spezies.

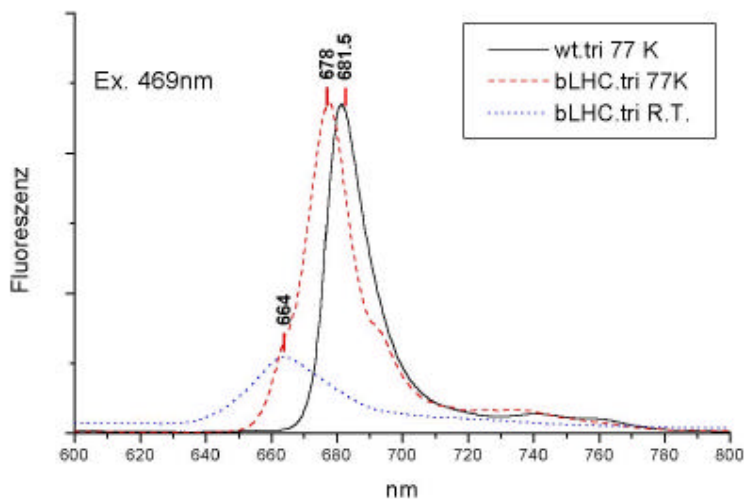


Abb. 41: Fluoreszenzemissionsspektrum bei Raumtemperatur und bei 77K. Anregung bei 469nm (entspricht Chl *b*). Probe: Trimerer LHC, welcher nur mit Carotinoiden und Chl *b* rückgefaltet wurde (bLHC.tri). Referenz: Mit allen Pigmenten rückgefalteter LHC (wt.tri). Nur der Peak bei 681.5nm wurde normalisiert, die Spektren der Chl *b* LHC-II Komplexe wurden an der gleichen Probe aufgenommen und unterscheiden sich nur in der Temperatur.

In Abbildung 41 ist ein Fluoreszenzspektrum der trimeren Komplexe gezeigt, welche nur Chl *b* enthalten. Diese emittieren die eingestrahlte Energie bei 664nm, was einer Rotverschiebung von ca. 10nm im Vergleich zu freiem Chl *b* entspricht. Kühlt man nun die Probe auf die Temperatur des flüssigen Stickstoffs ab, verschiebt sich die Emission zu 678nm, so dass sie nahe bei der Chl *a* Emission des nativen LHC's liegt. Außerdem enthält der Emissionspeak eine Schulter noch weiter im roten Bereich, so dass dort die Linienform ganz dem LHC entspricht, der mit allen Pigmenten rückgefaltet wurde. Die Peakverschiebung in Abhängigkeit von der Temperatur ist reversibel und hängt nicht von eventueller induzierter Aggregation der Probe beim Einfrieren ab, da es unwahrscheinlich scheint, dass sich beim Schockgefrieren Aggregate bilden, die sich beim Auftauen wieder auflösen. Die langwellige Fluoreszenz lässt sich dadurch erklären, dass im Chl *b*-LHC stark rot verschobene Chlorophyll *b* Moleküle enthalten sind, wie dies im Absorptionsspektrum durch die rote Schulter angedeutet ist. Nur bei der Reduzierung der thermischen Energie findet eine vollständige und irreversible Energieübertragung auf diese spektralen Spezies statt, was durch die rotverschobene Fluoreszenz detektiert wird.

3.5.5 Minimale Pigmentanforderung zur LHC-II Faltung

Im folgenden Versuch sollte bestimmt werden, welches die minimalen Pigmentanforderungen zur Faltung von trimeren LHC-II sind. Deshalb wurde im Rückfaltungsansatz nur Lutein und Chlorophyll *b* eingesetzt und eine Faltung mittels Nickel-Säule durchgeführt. Das rückgefaltete Protein enthielt sowohl Trimere als auch Monomere, welche über Saccharose-Dichtegradienten und auch auf einem Nativgel isoliert werden konnten; das entsprechende Zentrifugenröhrchen war identisch zu dem in Abbildung 38 gezeigten. In der spektroskopischen Charakterisierung bei Raumtemperatur verhielten sich die Proben identisch zu denen, die nur mit Chlorophyll *b* und allen Carotinoiden rückgefaltet wurden (vgl. Abschnitt 3.5.4). Durch HPLC Analyse konnte gezeigt werden, dass diese Komplexe nur Lutein und Chlorophyll *b* enthielten. Für die Trimere war das Verhältnis konsistent mit der Annahme von 3 gebundenen Luteinen pro Monomer und 14 Chlorophyll *b* Molekülen. Die Monomere hatten ein höheres Chlorophyll/Lutein Verhältnis, welches mit 2 Luteinen und 12 Chlorophyll *b* Molekülen interpretiert wurde. Diese Werte sind konsistent mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.5.3.

3.6 Pigmentbindungsmutanten des rekombinanten LHC-II

Aus der elektronenkristallographischen Struktur sind 9 Chlorophyll bindende Aminosäuren des LHC-II Proteins bekannt. Diese wurden im rekombinanten, *E.coli* exprimierten Protein durch ortsgerichtete Mutagenese zu Alanin oder Leucin ersetzt, und die Chlorophyll bindenden Seitenketten damit entfernt. Im Fall von Chlorophyll *a6*, das vermutlich über ein Wassermolekül an den Peptidyl Sauerstoff des Glycin 78 gebunden ist, wurde durch die Einführung großer hydrophober Reste versucht, den Chlorophyllliganden zu verdrängen

3.6.1 Faltung der Mutanten

Die Mutanten wurden auf einer Nickel-Affinitätssäule mit Carotinoiden und Chlorophyllen mit einem konstanten Chl *a/b* Verhältnis von 1.4 rückgefaltet, bei der Analyse auf einem Nativgel ergaben sich für alle 9 Mutanten Monomerbanden (Abb. 42). Nur im Falle von Glycin 78 (3: LG77/78VF), konnte ein Monomer nur bei einem extrem kurzen Lauf des Gels beobachtet werden, bei längerem Lauf verschwand dieser. Auch das Monomer der Mutante 8: Q131A war unter den Bedingungen des Gels instabil, jedoch bildete sie ein stabiles Trimer. Auf dem Gel konnten keine Trimere für die Mutanten 1: E65A, 2: H68A, 3: LG77/78VF und 9: N183A beobachtet werden.

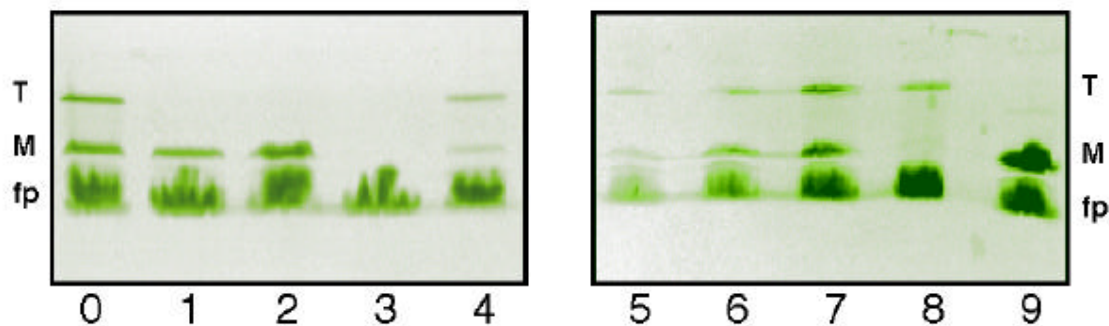


Abb. 42: Grünes Nativgel von rückgefalteten LHC-II Mutanten. T=Trimer, M=Monomer, fp= freie Pigmente. 0: Wildtyp, 1: E65A, 2: H68A, 3: LG77/78VF, 4: E139A, 5: E180A, 6: H197L, 7: H212A, 8: Q131A, 9: N183A.

Eine schonendere Aufreinigung der Mutanten konnte mittels Ultrazentrifugation auf Saccharose-Dichtegradienten durchgeführt werden (Abb. 43). Die so erhaltenen Banden konnten dann auch für eine spektroskopische Charakterisierung verwendet werden. Bei allen Mutanten waren Monomere zu beobachten, über den Monomeren befand sich eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Bande, welche aus partiell gefaltetem Protein bestand (siehe Abschnitt 3.3.1); dies ist besonders gut bei Mutante 5 in Abbildung 43 zu sehen. Die Mutanten 1: E65A, 2: H68A, 3: LG77/78VF zeigten auch hier keine Trimere, jedoch war bei

N183A im Saccharosegradienten stets ein Trimer isolierbar, im Gegensatz zum Nativgel. Nur manchmal bildeten auch die monomeren Mutanten 1: E65A, 2: H68A, 3: LG77/78VF extrem schwache Trimerbanden, welche für die HPLC Analyse verwendet werden konnten; dieser Trimer ist sehr schwach bei Mutante 1: E65A in Abbildung 43 zu erkennen. Die beobachteten leichten relativen Verschiebungen zwischen den Gradienten sind wahrscheinlich auf geringfügige Unterschiede in der Saccharosekonzentration zurückzuführen, da die abgebildeten Gradienten durch Einfrier- und Auftauzyklen erzeugt wurden.

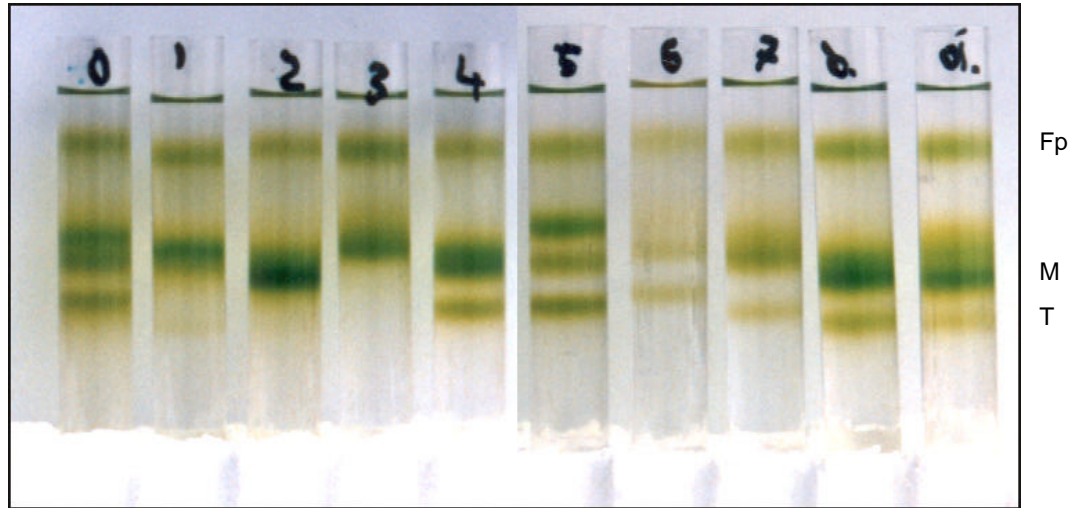


Abb. 43: Saccharose-Dichtegradienten der LHC-II Mutanten. Fp= freie Pigmente, M=Monomere, T=Trimere. 0: Wildtyp, 1: E65A, 2: H68A, 3: LG77/78VF, 4: E139A, 5: E180A, 6:H197L, 7:H212A, 8.: Q131A, 9.:N183A.

3.6.2 Pigmentanalyse der Mutanten

Rückgefaltetes mutiertes Protein wurde über Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation oder über ein grünes Nativgel isoliert. Die Pigmente wurden aus den jeweiligen Banden extrahiert und mittels HPLC analysiert. Dies erlaubte die zuverlässige Quantifizierung auch gering konzentrierter Proben, außerdem konnten in einem HPLC Lauf gleichzeitig Chlorophylle und Carotinoide detektiert werden (Tab. X). Die zuverlässigsten Werte wurden bei den trimeren Spezies bestimmt – diese stellen den nativen oligomeren Zustand des LHC-II dar, der gemessene Pigmentgehalt kam dem nativen LHC-II am nächsten. Für die Mutanten 1: E65A, 2: H68A und 3: LG77/78VF wurde auch der Pigmentgehalt der nur ca. in der Hälfte der Experiment auftretenden sehr schwachen Trimerbanden bestimmt.

	Trimere, Saccharosegradient	Monomere, Saccharosegradient	Monomere, Gel
0: Wildtyp	1.22 ± 0.06 (14)	1.62 ± 0.28 (12)	1.03 ± 0.17 (11)
1: E65A, <i>a4</i>	1.40 ± 0.17 (4)	2.07 ± 0.39 (7)	0.90 ± 0.11 (5)
2: H68A, <i>a5</i>	1.10 ± 0.08 (3)	1.37 ± 0.09 (7)	0.85 ± 0.04 (5)
3: LG77/78VF, <i>a6</i>	2.21 ± 0.27 (3)	2.10 ± 0.09 (7)	2.27 ± 0.22 (3)
4: E139A, <i>b5</i>	1.38 ± 0.13 (7)	2.34 ± 0.28 (7)	0.86 ± 0.06 (5)
5: E180A, <i>a1</i>	1.11 ± 0.12 (6)	1.30 ± 0.31 (6)	0.93 ± 0.04 (3)
6: Q197L, <i>a3</i>	0.96 ± 0.08 (6)	1.02 ± 0.11 (6)	0.58 ± 0.08 (4)
7: H212A, <i>b3</i>	1.06 ± 0.05 (6)	1.13 ± 0.08 (6)	0.86 ± 0.07 (4)
8: Q131A, <i>b6</i>	1.57 ± 0.14 (6)	1.90 ± 0.28 (6)	2.25 ± 0.16 (4)
9: N183A, <i>a2</i>	1.14 ± 0.12 (6)	1.40 ± 0.31 (6)	0.86 ± 0.04 (5)

Tabelle 8: Chl *a/b* Verhältnis der rückgefalteten LHC-II Mutanten. Die Mutanten sind mit den veränderten Aminosäuren und den zugehörigen Chlorophyllen bezeichnet. Trimere und Monomere aus der Säulenfaltung wurden auf Saccharosegradienten aufgereinigt, während Monomere aus der Faltung durch Detergenzpräzipitation auf grünen Gelen aufgetrennt wurden, die ausgeschnittenen Gelbanden wurden analysiert. In Klammern ist die Anzahl der durchgeführten Versuche angegeben.

Zur Visualisierung sind die Werte der Trimere zusätzlich in Abbildung 44 graphisch dargestellt.

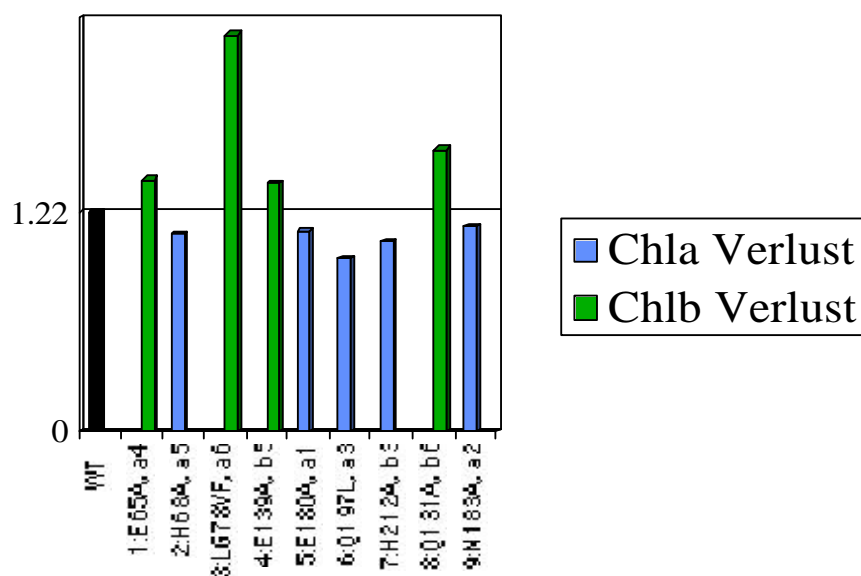


Abb. 44: Chl *a/b* Verhältnisse der LHC-II Trimere. Mutanten mit höherem Chl *a/b* haben Chl *b* verloren und sind grün dargestellt, Mutanten mit niedrigerem Chl *a/b* haben Chl *a* verloren und sind blau dargestellt.

Das Chl *a/b* Verhältnis der rückgefalteten Wildtyp Trimere lag mit 1.2 nahe bei dem des nativ isolierten Komplexes, welches je nach Isolationsmethode zwischen 1.1 und 1.4 angegeben wird (z.B. Peter & Thornber, 1991; Butler & Kühlbrandt, 1988). Eine Erniedrigung dieses Verhältnisses, welches auf den Verlust von Chl *a* hindeutet, wurde bei den Mutanten 2: H68A, 5: E180A, 6: H197L, 7: H212A, 9: N183A gefunden, während für die Mutanten 1: E65A, 3: LG77/78VF, 4: E139A, 8: Q131A das umgekehrte galt. Die Mutante 3: LG77/78VF wich mit ihrem Chl *a/b* Verhältnis von 2.2 sehr stark vom Wildtyp ab, hier wurde mehr als ein Chlorophyll Molekül verloren (siehe unten). Mutanten ohne Veränderung des Chl *a/b* Verhältnisses wurden nicht gefunden.

In Tabelle 8 sind auch die Werte für die LHC-II Monomere dargestellt, welche von den Saccharose-Dichtegradienten oder aus den grünen Nativgelen isoliert wurden. Obwohl die Monomere aus den Saccharosegradienten alle ein höheres Chl *a/b* Verhältnis aufwiesen (Chl *b* Verlust), stimmten die Werte bei allen Mutanten tendenziell mit den Trimeren überein. Im Gegensatz dazu führte die Auftrennung auf einem Gel zu einer Erniedrigung des Chl *a/b* Verhältnisses, also zum Verlust von Chl *a*. Die hierdurch erhaltenen Daten bestätigen die Ergebnisse der Trimere, außer im Fall der Mutanten 1: E65A und 4: E139A. Bei diesen schien der unspezifische Verlust von Chlorophyll *a*, der durch vermutlich durch die Einwirkung von SDS auf die Komplexe während des Gellaufes verursacht ist, den spezifischen Effekt der Mutation zu überwiegen.

In Tabelle 9 ist die Anzahl der gebundenen Chlorophyllmoleküle pro monomeren Komplex gezeigt. Da diese auf den internen Standard, 2 Lutein Moleküle pro Monomer, bezogen sind, unterliegen sie einer höheren Schwankung. Beim Wildtypprotein erkennt man, dass die Gradienten-Monomere ca. ein Chl *b* Molekül weniger als die Trimere enthalten, während bei den Gel-Monomeren ca. zwei Chl *a* Moleküle fehlen. Fast alle Mutanten haben im Vergleich zum Wildtyp nur ca. ein Chlorophyll Molekül verloren. Eine leichte Zunahme der einen oder anderen Chlorophyll Spezies reflektiert wahrscheinlich eine Variation in der Bestimmung des internen Standards, und nicht den Wechsel der Chlorophyllspezifität einer Bindungsstelle. Ausnehmend große Veränderungen finden sich bei Mutante 3: LG77/78VF; dies lässt auf unspezifischen Pigmentverlust auf Grund der Instabilität dieses Komplexes schließen. Die Veränderung des Chlorophyllgehalts, der Trimere, der Gradienten-Monomere und der Gel-Monomere ist konsistent mit der oben gegebenen Interpretation der Bindungsstellenspezifität.

	Trimere, Saccharosegradient	Monomere, Saccharosegradient	Momonere, Gel
Wildtyp	(14) ^a	(12)	(8)
Chl <i>a</i>	7.6 ± 0.8	7.8 ± 1.1	5.3 ± 0.34
Chl <i>b</i>	6.1 ± 0.4	5.1 ± 1.0	5.7 ± 0.17
1: E65A, <i>a4</i>	(4)	(4)	(5)
? Chl <i>a</i>	-0.4 ± 0.43	-1.4 ± 0.20	-0.7 ± 0.12
?Chl <i>b</i>	-0.9 ± 0.46	-2.6 ± 0.19	-0.2 ± 0.33
2: H68A, <i>a5</i>	(3)	(4)	(5)
? Chl <i>a</i>	-0.9 ± 0.18	-1.3 ± 0.18	-0.7 ± 0.38
?Chl <i>b</i>	-0.3 ± 0.25	-0.5 ± 0.33	-0.1 ± 0.21
3: LG77/78VF, <i>a6</i>	(3)	(4)	(2)
? Chl <i>a</i>	+1.8 ± 1.07	+0.1 ± 0.52	+2.2 ± 0.55
?Chl <i>b</i>	-2.0 ± 0.23	-1.6 ± 0.50	- 2.4 ± 0.21
4: E139A, <i>b5</i>	(7)	(4)	(5)
? Chl <i>a</i>	-0.5 ± 0.51	-1.1 ± 0.55	-1.2 ± 0.49
?Chl <i>b</i>	-1.1 ± 0.52	-2.6 ± 0.35	-0.8 ± 0.66
5: E180A, <i>a1</i>	(6)	(4)	(2)
? Chl <i>a</i>	-0.4 ± 0.44	-0.9 ± 1.19	-0.2 ± 0.09
?Chl <i>b</i>	+0.3 ± 0.44	+0.7 ± 0.53	0 ± 0.22
6: Q197L, <i>a3</i>	(6)	(4)	(3)
? Chl <i>a</i>	-0.7 ± 0.94	-2.2 ± 1.16	-2.0 ± 0.02
?Chl <i>b</i>	+0.9 ± 0.35	+0.2 ± 0.63	+0.2 ± 0.06
7: H212A, <i>b3</i>	(6)	(4)	(5)
? Chl <i>a</i>	-0.4 ± 0.53	-1.0 ± 0.40	-0.6 ± 0.34
?Chl <i>b</i>	+0.5 ± 0.29	+0.6 ± 0.69	-0.1 ± 0.23
8: Q131A, <i>b6</i>	(6)	(4)	(7)
? Chl <i>a</i>	0 ± 0.51	-1.2 ± 0.39	+1.5 ± 0.88
?Chl <i>b</i>	-1.3 ± 0.51	-2.1 ± 0.28	-2.4 ± 0.45
9: N183A, <i>a2</i>	(6)	(4)	(7)
? Chl <i>a</i>	-1.6 ± 0.37	-2.6 ± 0.58	-0.4 ± 0.25
?Chl <i>b</i>	-0.7 ± 0.40	-1.1 ± 0.12	0 ± 0.16

Tabelle 9: Chlorophyllgehalt der LHC-II Mutanten, der durch HPLC Analyse bestimmt wurde. Gezeigt sind die Anzahl der Chlorophyllmoleküle pro Monomer, bzw. für die Mutanten die Unterschiede zum Wildtyp. Für die Quantifizierung wurden 2 Lutein Moleküle pro Monomer angenommen. Anzahl unabhängiger Faltungsexperimente in Klammern.

Die Mutanten mit der Nummerierung 1-3 sind diejenige, welche keine oder nur sehr schwache Trimere bildeten. Um festzustellen, ob dies ein Effekt des verlorenen Chlorophylls war, oder nur zufällig auf die neu eingeführte Aminosäure zurückzuführen war, wurden weitere Mutanten 1': E65L, 2': H68L, 3': G78I generiert. Bei den Mutanten 1' und 2' wurde nun Leucin statt Alanin eingeführt. Bei der Mutante 3' wurde nur die Aminosäure Glycin,

welche Chl *a6* über die Carbonylgruppe bindet, gegen eine hydrophobe Aminosäure mittlerer Größe, Isoleucin, ersetzt.

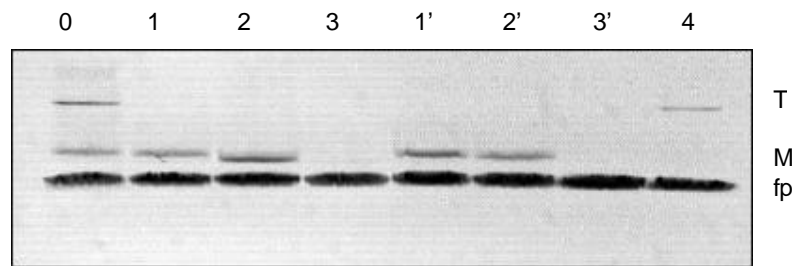


Abb. 45: Grünes Gel von LHC-II Mutanten. T=Trimer, M=Monomer, fp=freie Pigmente. 0: Wildtyp, 1: E65A, 2: H68A, 3: LG77/78VF, 1': E65L, 2': H68L, 3': G78I, 4: E139A.

Wie in Abbildung 45 zu sehen, ist das Faltungsmuster bei den Mutanten 1-3 und 1'-3' jeweils gleich, Veränderungen der Reste 65 und 68 (Mutanten 1, 1', 2, 2') führen zum Verlust der Trimerisierung, während Veränderungen am Glycin 68 (Mutanten 3,3') das Protein so stark destabilisieren, dass keine gefalteten Spezies mehr auf einem grünen Gel isoliert werden können. Im Saccharose-Dichtegradienten zeigten jedoch alle Mutanten eine Monomerbande (ohne Abb.). Ihre Chlorophyllspezifität stimmte mit denen der Mutanten 1-3 überein (Tabelle 10). Dies zeigt deutlich, dass die Gradienten-Zentrifugation eine schonendere und dadurch geeignetere Methode zur Reinigung der Mutanten darstellt.

Monomere, Saccharosegradient		Monomere, Saccharosegradient	
1: E65A, <i>a4</i>		1': E65L, <i>a4</i>	
? Chl <i>a</i>	+0.3	? Chl <i>a</i>	0
?Chl <i>b</i>	-2.4	?Chl <i>b</i>	-1.4
2: H68A, <i>a5</i>		2': H68L, <i>a5</i>	
? Chl <i>a</i>	-0.7	? Chl <i>a</i>	-0.6
?Chl <i>b</i>	-0.4	?Chl <i>b</i>	-0.6
3: LG77/78VF, <i>a6</i>		3': G78I, <i>a6</i>	
? Chl <i>a</i>	+0.6	? Chl <i>a</i>	+1.1
?Chl <i>b</i>	-1.2	?Chl <i>b</i>	-2.8

Tabelle 10: Chlorophyllgehalt der LHC-II Mutanten im Vergleich zum Wildtyp, vgl. Tabelle 9.

Die durch die HPLC analysierte Veränderung der Mutanten (1-9) im Chlorophyllgehalt konnte auch durch spektrale Analyse der Komplexe bei Raumtemperatur bestätigt werden. Die Raumtemperaturspektren zeigten keine prinzipiellen Unterschiede zu den Tieftemperaturspektren, deshalb werden in Abschnitt 3.6.3 nur die besser aufgelösten Tieftemperaturspektren vorgestellt.

Einige Mutanten waren auch im Xantophyllgehalt der β -Carotinoide Violaxanthin und Neoxanthin verändert (Tabelle 11). Ihr Gehalt war in den entsprechenden Trimeren auf ca. die Hälfte des Wildtyp-Gehalts reduziert. Die Mutanten 8: Q131A und 3: LG77/78VF fielen besonders dadurch auf, dass Violaxanthin und Neoxanthin in aus dem Gel isolierten Komplexen ganz abwesend waren. Der reduzierte Xantophyllgehalt dieser Mutanten gibt Aufschluss über die strukturelle Lokalisation der hier fehlenden Carotinoide in der LHC-II Struktur: Sie müssen nahe der Helix C des Strukturmodells lokalisiert sein, und in Nachbarschaft zu den Chlorophyll *b* Molekülen, die bei diesen Mutanten fehlen.

	Violaxanthin	Neoxanthin
Wildtyp (5)	0.37 ± 0.12	0.92 ± 0.04
3: LG77/78VF (3)	0.19 ± 0.05	0.05 ± 0.04
4: E139A (7)	0.21 ± 0.06	0.44 ± 0.15
8: Q131A (4)	0.34 ± 0.08	0.54 ± 0.07

Tabelle 11: Gehalt der mutierten LHC-II Trimere an β -Carotinoiden. Die nicht aufgeführten Mutanten waren unverändert. Bezugsgröße: 2 Luteine pro Monomer. Anzahl unabhängiger Faltungsexperimente in Klammern.

3.6.3 Absorptionsspektren der Mutanten

Die Banden aus den Saccharose-Dichtegradienten wurden auch spektroskopisch untersucht. Mutierte Trimere, die interessante spektroskopische Eigenschaften erwarten ließen, wurden in größerem Maßstab isoliert, aufkonzentriert und für die Aufnahme von Spektren bei der Temperatur des flüssigen Heliums (4K) verwendet.

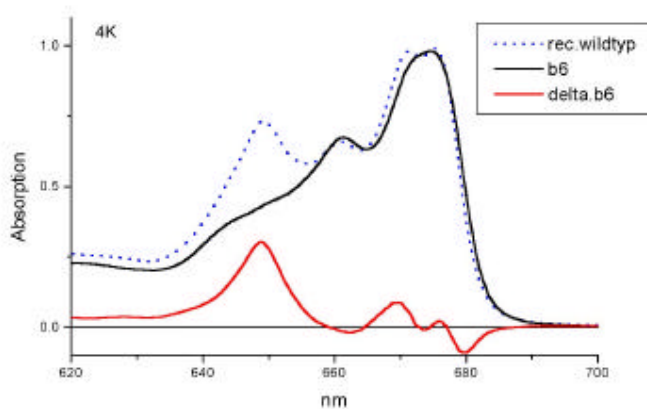


Abb. 46: Absorptionsspektrum der trimeren Mutante Q131A (*b6*) bei 4K im Vergleich zum rückgefalteten Wildtyp.

In Abbildung 46 ist das Tieftemperaturspektrum der Mutante Q131A (Chl *b6*) im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Es ist bereits direkt aus dem Spektrum klar erkennbar, dass in der Mutante hauptsächlich eine Bande bei 649 nm fehlt. Die HPLC Analyse der verwendeten Probe ergab, dass ca. 2 Chl *b* Moleküle im Vergleich zum Wildtyp fehlen, dies bedingt die stark ausgeprägte Reduktion der Chl *b* Absorption, welche durch die Reduktion des Neoxanthingehaltes der Mutante Q131A noch verstärkt wird: Eine Nichtbesetzung der Neoxanthinbindestelle führt ebenfalls zu einer Reduktion der Chl *b* Q_y Absorption bei 650nm (siehe Abschnitt 3.5.3). Dadurch ist jedoch eine Schulter bei 642nm besonders gut zu erkennen, was bedeutet, dass diese Absorptionsbande in der Mutante noch vorhanden ist. Die kleineren Änderungen, welche vor allem im Differenzspektrum sichtbar sind, deuten auf eine leichte Rotverschiebung einer Bande von 669nm zu 679nm in der Mutante hin. Auch insgesamt erscheint das Spektrum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp um 1nm leicht rotverschoben.

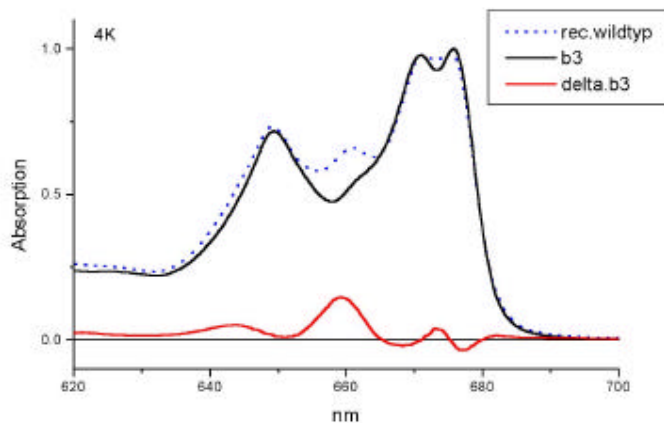


Abb. 47: Absorptionsspektrum der trimeren Mutante H212A (b3) bei 4K im Vergleich zum rückgefalteten Wildtyp.

Bei der Mutante H212A (Chl *b3*, jetzt Chl *a*) ist vor allem der Gipfel zwischen der spektralen Chl *a* und Chl *b* Region reduziert, was zu einem Differenzpeak bei 659nm führt (Abb. 47). Da die HPLC Analyse für die hier verwendete Probe das Fehlen von ca. einem Chl *a* Molekül ergab, kann jetzt der Chlorophylltyp und die spektrale Region des Chl *b3* zugeordnet werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.5.4 zeigt dies, dass im Bereich bei 660nm sowohl Chl *a*, als auch Chl *b* absorbieren können, wenn sie im LHC-II gebunden sind.

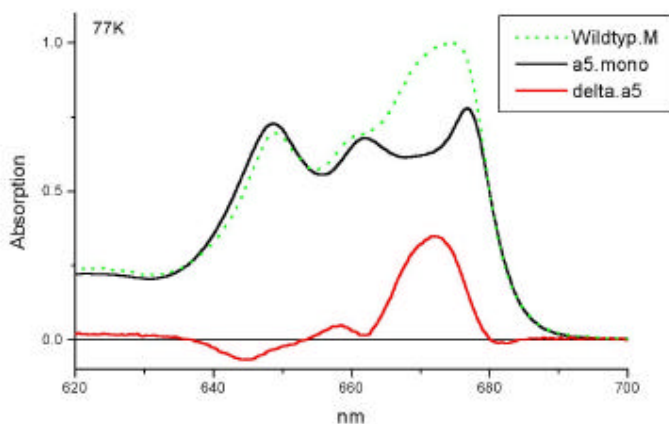


Abb. 48: Absorptionsspektrum der monomeren Mutante H68A (a5) bei 77K im Vergleich zum rückgefalteten, monomeren Wildtyp.

Die Mutante H68A (Chl *a5*) bildet nur Monomere, welche weniger stabil als Trimere sind. Um den Konzentrierungsschritt bei der Probenvorbereitung zu vermeiden, welcher für die 4K Apparatur nötig war, wurde sie nur bei 77K vermessen, was zu einer fast identischen Auflösung führt. Trotz der verbreiterten Banden der monomeren Komplexe, lässt sich das Chl

a5 klar der spektralen Region bei 672nm zuordnen (Abb. 48). Die HPLC Analyse der hier gezeigten Proben ergab, dass ca. ein Chl *a* Molekül im Vergleich zu den Wildtyp Monomeren fehlte.

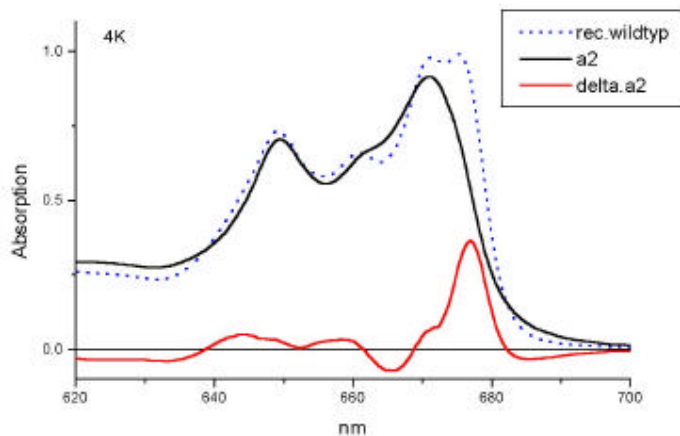


Abb. 49: Absorptionsspektrum der trimeren Mutante N183A (a2) bei 4K im Vergleich zum rückgefalteten Wildtyp.

Im Hinblick auf die Energieübertragung im LHC-II Komplex erwies sich die Mutante N183A (Chl *a2*) als besonders interessant, da hier ein langwelliges Chlorophyll betroffen war, welches für die terminale Energieübertragung in Frage kommt. In Abbildung 49 ist das zugehörige Absorptionsspektrum dargestellt, welches einen klaren Differenzpeak bei 677nm zeigt. Die HPLC Analyse ergab das Fehlen von ca. einem Molekül Chl *a* für die hier dargestellte Probe. Eine weitergehende spektroskopische Analyse dieser Mutante mittels Fluoreszenzspektroskopie ist am Ende dieses Abschnitts beschrieben.

Bei einigen der Mutanten konnte auf Grund der spektroskopischen Messungen keine eindeutige Zuordnung der Wellenlänge des betroffenen Pigmentes gemacht werden:

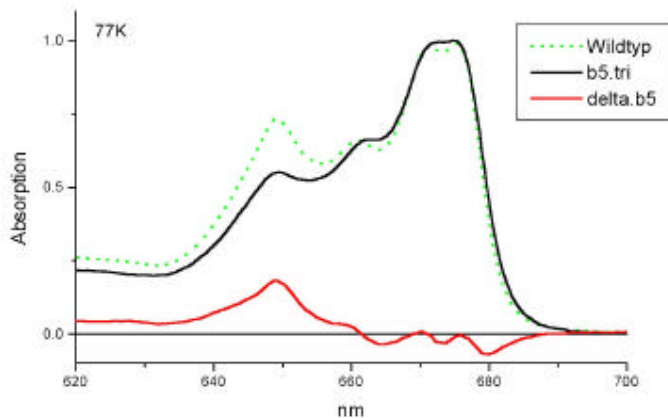


Abb. 50: Absorptionsspektrum der trimeren Mutante E139A (b5.tri) bei 77K im Vergleich zum Wildtyp.

In Abbildung 50 ist das Spektrum der Mutante E139A (Chl *b5*) gezeigt. Hier ist vor allem die Region bei 649nm reduziert, jedoch dehnt sie sich deutlich in den kürzerwelligen Bereich aus. Die Reduktion bei 649nm ist entweder auf das Fehlen eines entsprechenden Chlorophylls zurückzuführen, oder aber auch auf eine Reduktion des Neoxanthingehaltes bei dieser Mutante, welche ebenfalls zu einer Reduzierung der Chlorophyll *b* Q_y Absorptionsbande führt. (vgl. Abschnitt 3.5.3). Weiterhin wirkt sich eine Veränderung des Chl *a/b* Verhältnisses verstärkt auf die Region bei 650nm aus; dies geht aus dem Vergleich von Spektren des Wildtyps hervor, die mit leicht unterschiedlichen Chl *a/b* Verhältnissen gefaltet wurden, und ist auch bei den Chlorophyll-Austauschexperimenten in Abschnitt 3.5.2 zu sehen. Deshalb steht nicht eindeutig fest, ob Chl *b5* der spektralen Region bei 650nm oder einer kürzerwelligen Region zuzuordnen ist.

Auch beiden restlichen Mutanten konnte dem jeweiligen Chlorophyll keine eindeutige Wellenlänge zugeordnet werden (Abb. 51). Die Ursachen hierfür können spektroskopischer Natur sein, oder aber in der Instabilität dieser Proben begründet liegen:

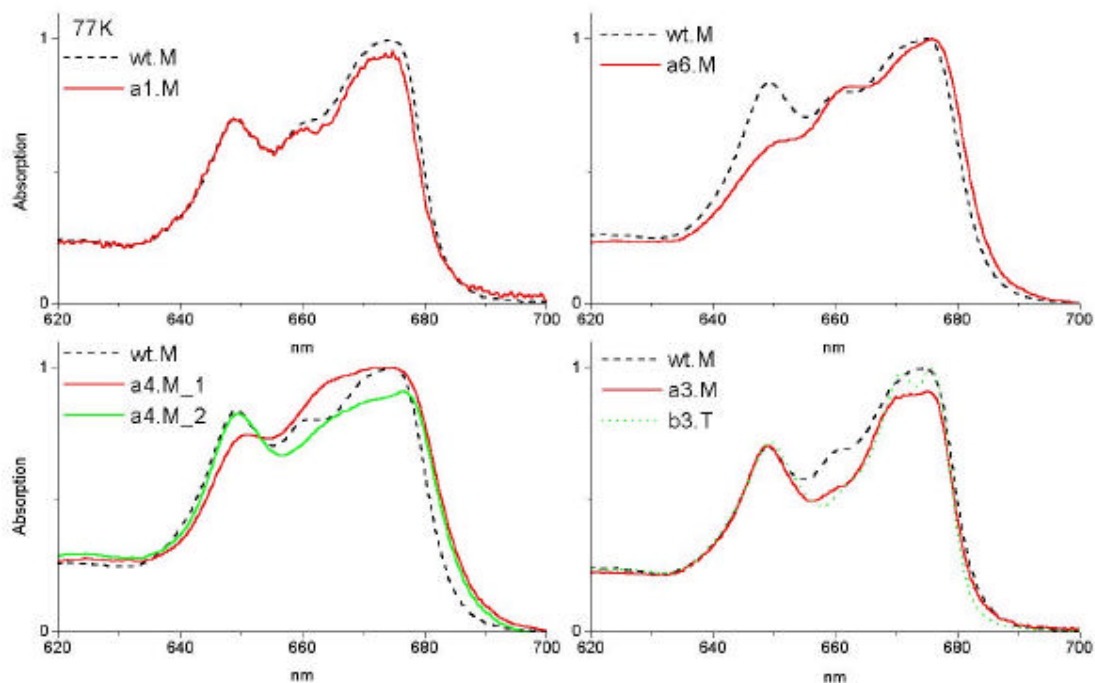


Abb. 51: Absorptionsspektren von mutierten LHC-II Monomeren bei 77K. wt.M: Wildtyp, a1.M: E180A, a6.M: LG77/78VF, a4.M: E65A, a3.M: Q197L, b3.T: H212A (Trimer bei 4K)

Obwohl die Mutante E180A (Chl *a1*) regelmäßig Trimere bildete, waren diese nicht ausreichend konzentriert für eine spektroskopische Analyse. Auch ein Spektrum der Monomere lieferte keinen Hinweis darauf, welche spektrale Region dem Chl *a1* zuzuordnen ist (Abb. 51, oben links). Möglicherweise hatte das Entfernen einer Salzbrücke in dieser Mutante einen weitreichenderen Effekt auf die Proteinstruktur und die Absorption mehrerer Pigmente, so dass dies zum Verlust der spektralen Auflösung führte. Die Mutante LG77/78VF (Chl *a6*) zeichnete sich durch eine hohe Instabilität aus, welche zum Verlust mehrerer Chlorophylle und wahrscheinlich auch zur Beeinflussung des gebundenen Luteins führte, welches als interner Standard für die Pigmentbestimmung diente. Das zugehörige Spektrum (Abb. 51, oben rechts) ist dafür erstaunlich klar, es ähnelt stark dem der Mutante Q131A (Chl *b6*), da vor allem der Chlorophyll *b* Peak bei 649nm erniedrigt ist und das Spektrum insgesamt eine leichte Rotverschiebung aufweist.

Die Mutante E65A (Chl *a4*), bei der wie bei E139A und E180A eine Salzbrücke unterbrochen war, bildete nur Monomere, welche reduzierten Chlorophyll *b* Gehalt aufwiesen. In Abb. 51, unten links, sind zwei Spektren von zwei unabhängigen Rückfaltungsexperimenten gezeigt. Nur in einem ist auch eine deutliche Reduktion des Chl *b* Gehalts im Spektrum ersichtlich.

Beide Spektren sind an der langwelligen Flanke verbreitert. Der Chlorophyll *a* Peak ist außerdem auch im Kurzwelligen stark erweitert und erstreckt sich nun fast bis zu 660nm. Die großen Änderungen bei dieser Mutante deuten darauf hin, dass mehrere Chlorophylle in ihren spektralen Eigenschaften verändert wurden. Die unterbrochene Salzbrücke kann dazu durch die nicht mehr abgeschirmte Ladung oder durch eine Veränderte Faltung des Gesamtkomplexes beitragen.

Da die Mutante Q197L (Chl *a3*) nur selten ausreichend konzentrierte Trimere bildete, ist in Abbildung 51, unten rechts, das Monomerspektrum gezeigt. Dies ist erstaunlicherweise dem der Mutante H212A (Chl *b3*, jetzt Chl *a*) sehr ähnlich, hauptsächlich ist die Region bei 660nm reduziert. Außerdem sind noch die beiden Chl *a* Hauptgipfel bei 672 und 676nm erniedrigt. Chlorophyll *a3* ist im LHC-II in enger Nachbarschaft zu Chl *b3* lokalisiert, welchem die Wellenlänge 659nm zugeordnet wurde. Durch den Ausfall von Chl *a3* kann die Bindungstasche des Chl *b3* verändert sein, diese Kopplung macht sich auch spektral bemerkbar. Weiterhin weist das relativ stark erniedrigte Chl *a/b* Verhältnis der Mutante Q197L darauf hin, dass ein weiteres Chl durch die Mutation teilweise entfernt ist, was aller Wahrscheinlichkeit nach das Chl *b3* ist. Zusammenfassend ergeben sich folgende Interpretationsmöglichkeiten für das Spektrum der Mutante Q197L: 1. Chl *a3* absorbiert im Bereich von 670nm, die Reduktion bei 660nm ist dem Verlust von Chl *b3* zuzuschreiben, oder 2., Chl *a3* absorbiert entweder direkt, oder über excitonische Kopplung an Chl *b3*, im Bereich von 660nm.

3.6.4 Fluoreszenzspektren der Mutanten

Die Energieübertragung von Chl *b* auf Chl *a*, wie sie in einem Fluoreszenzmissionsspektrum gemessen wird, dient als funktioneller Test des LHC-II. Ein Vergleich der Spektren aller Trimerbanden aus dem Saccharosedichtegradient bei Raumtemperatur zeigte eine Veränderung nur bei der Mutante N183A (Chl *a2*), bei welcher das langwelligste Chlorophyll fehlt (Abb. 52). Das Emissionsmaximum war hier im Vergleich zum Wildtyp Komplex um 3-4nm ins Kurzwellige verschoben.

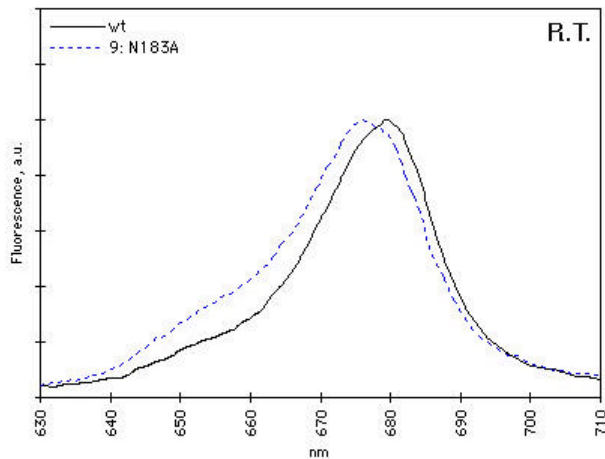


Abb. 52: Fluoreszenzemissionsspektrum von trimeren Wildtyp LHC-II und der Mutante N183A (Chl *a2*) bei Raumtemperatur. Anregung erfolgte in der Soret-Bande des Chl *b* bei 469nm.

Bei dieser Mutante wurden deshalb auch Fluoreszenzspektren bei tiefer Temperatur aufgenommen (Abb. 53), die Halbwertsbreite der Bande (FWHM) des Wildtyps wurde dadurch von 20 auf 15nm reduziert. Auch hier zeigte sich deutlich die Verschiebung des Emissionsmaximums von 681.5nm beim Wildtyp zu 677.5nm in der Mutante.

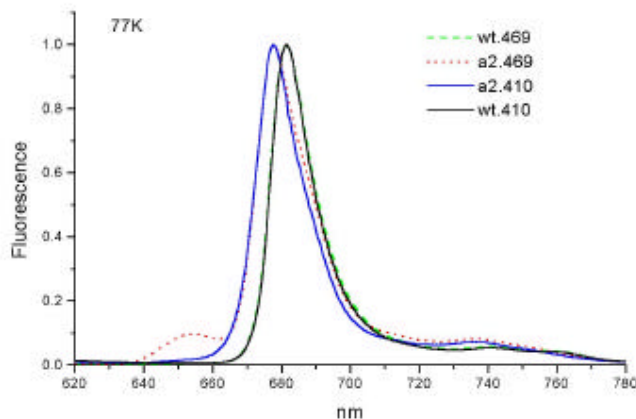


Abb. 53: Fluoreszenzemissionsspektrum von trimeren Wildtyp LHC-II und der Mutante N183A (Chl *a2*) bei 77K. Anregung erfolgte entweder in der Soret-Bande des Chl *b* bei 469nm oder des Chl *a* bei 410nm.

Beim Wildtyp sind die Emissionsspektren identisch, welche durch Anregung des Chl *a* (410nm) oder Chl *b* (469nm) erzeugt wurden; dies ist ein Indikator für eine vollständige und effiziente Energieübertragung auf ein oder mehrere emittierende Chlorophylle. Bei der Mutante N183A ist bei der Anregung des Chl *b* auch eine geringe Emission im Chl *b* Bereich

bei 655nm zu erkennen, was auf einen kleinen Teil energetisch nicht gekoppelter Chl *b* Molekülen hinweist. Außerdem ist zu erkennen, dass das Spektrum der Mutante an der langwelligen Flanke des Peaks bei 690nm mit dem des Wildtyps übereinstimmt, jedoch nur wenn Chl *b* (469nm) angeregt wird. Bei Anregung von Chl *a* (410nm) ist auch die langwellige Flanke ins Blaue verschoben und stimmt nicht mit dem Wildtyp überein. Entsprechend erhöhte sich die Halbwertsbreite der Bande von 16.5nm bei Chl *a* Anregung auf 18.5nm bei Chl *b* Anregung. In diesen Komplexen ist also die Form des Emissionspeaks abhängig von der Anregungswellenlänge. Dies bedeutet, dass es Unterschiede in den emittierenden Chl Spezies gibt, je nachdem ob Chl *a* oder Chl *b* angeregt wurde. Durch den Wegfall des Chl *a2* in dieser Mutante wurde die optimale Wechselwirkung zwischen den zuleitenden Chlorophyllen im Komplex beeinflusst bzw. geschwächt.

4 Diskussion

4.1 Expression und Faltung durch Metallaffinitäts-Chromatographie

Die pflanzlichen LHC Gene sind im Kerngenom des Organismus codiert, werden im Cytosol exprimiert, und müssen deshalb zum Chloroplasten transportiert werden. Nach Überquerung der beiden Hüllmembranen des Chloroplasten werden sie in die Thylakoide integriert, dort erreichen sie durch die Bindung der Pigmente den nativen, gefalteten Zustand. Da es möglich ist, den Vorgang der LHC Insertion in isolierte Chloroplasten (Schmidt et al., 1981) oder in Thylakoide (Cline, 1986) *in vitro* durchzuführen, bietet sich dieses System prinzipiell für die Herstellung von manipulierten Lichtsammelkomplexen an. Es konnte gezeigt werden, dass mutante LHC-Polypeptidketten, die den Mutanten aus der vorliegenden Arbeit entsprechen, in Thylakoide inserieren und stabile Trimere bilden (Yang et al., 1999). Dies konnte jedoch nur im kleinen Maßstab durchgeführt werden. Für die Herstellung von größeren Mengen an Protein wurden transgene Pflanzen verwendet und der rekombinante LHC-II Komplex mittels Hexa-Histidin-Markierung abgetrennt (Flachmann & Kühlbrandt, 1996). Bei der Einführung zweier Punktmutanten war jedoch der Anteil des rekombinanten LHC-II am Gesamt LHC-II kleiner als 1/1000, so dass sich auch dieses System nicht für eine quantitative Herstellung von mutantem LHC-II eignete.

Als Alternative bietet sich die *in vitro* Rekonstitution des LHC-II an, die bereits seit mehr als einem Jahrzehnt bekannt ist (Plumely & Schmidt, 1987). Das Proteins kann hierbei in *E. coli* exprimiert werden, so dass man den Vorteil der einfachen genetischen

Manipulationsmöglichkeiten des bakteriellen Systems erlangt. Die Expression des LHC Apoproteins erfolgt in Einschlusskörpern, und ist deshalb in großen Mengen möglich.

Da eine effiziente Aufreinigung von Chlorophyll *b* nur über eine präparative HPLC Säule möglich ist, stellt dies einen Engpass bei der Beschaffung der Ausgangsmaterialien für eine Rekonstitution dar. Der limitierende Faktor bei der Rückfaltung selbst ist die Trimerisierung von LHC-II. Hier wurde durch das ausgearbeitete Protokoll eine deutliche Erleichterung erzielt – sowohl die Faltung, als auch die Oligomerisierung konnte in einem Experiment durchgeführt werden, während das Protein auf der Säule gebunden war.

Die Faltung von Proteinen aus *E. coli* Einschlusskörpern (inclusion bodies) entwickelt sich zu einer Standardmethode, welche den Vorteil hoher Expressionsraten und einfacher Aufreinigung mit sich bringt. Außerdem treten eventuell toxische Eigenschaften eines exprimierten Fremdproteins für die Bakterienzelle in der Regel nicht im entfalteten, d.h. nicht funktionellen Zustand des Proteins auf (Rudolph & Hauske, 1996). Die Expression von Einschlusskörpern und die Faltung für Membranproteinen wurde erst bei wenigen Proteinen erfolgreich durchgeführt (Grisshammer & Tate, 1995). Es handelte sich um sehr stabile Proteine, wie Porine oder Bacteriorhodopsin, oder es wurden spezielle Faltungsmethoden, z.B. in Liposomen, verwendet. Die Faltung von Histidin-markiertem Polypeptid auf einer Affinitätssäule ist auch auf andere Proteine übertragbar. So konnte die Methode nicht nur mit dem α -helicalen LHC-II, sondern auch auf die Rückfaltung des β -Faltblatt-Proteins Toc 75 des Chloroplasten Proteinimportkomplexes angewandt werden (Rogl et al., 1998). Erstaunlicherweise konnte LHC Polypeptid mit N-terminaler Histidin-Markierung nicht an die Säule gebunden werden, da die Histidinreste offenbar nicht eine geeignete Struktur zur Chelatierung des Nickels ausbilden konnten. Dieses Phänomen ist auch bei anderen Proteinen bekannt, es gibt jedoch keine generelle Regel, ob der C-Terminus oder der N-Terminus geeigneter für eine funktionelle Histidin-Markierung ist (David Parcej, persönliche Mitteilung). Die Bindung an das Säulenmaterial verhindert, dass die entfalteten Proteine aggregieren, und ahmt in diesem Punkt die Funktion von Chaperonen nach (Voet & Voet, 1992). Die Methode ist deshalb besonders für Proteine geeignet, die zur Aggregation neigen oder deren Faltung in mehreren Schritten durchgeführt werden muss, also z.B. für Membranproteine. Diese Strategie wurde direkt durch eine „Rückfaltungssäule“ mit immobilisierten GroEL Chaperonen angewendet (Altamirano et al., 1997). Die hier vorgestellte Faltung mittels Nickel-Affinitätssäule stellt hierzu eine einfachere Alternative dar. Die Fremdexpression und Rückfaltung von Membranproteinen für biochemische und strukturelle Studien ist besonders für die Polypeptide von Bedeutung, welche nur in geringer

Menge im Organismus vorhanden sind. Die hier vorgestellte Methode stellt ein geeignetes Verfahren für diesen Weg dar.

4.2 In Vitro Rekonstitution des LHC-II

Wie durch Nativgelelektrophorese und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gezeigt, werden nach der Faltung auf der Nickel-Affinitätssäule verschiedene Formen von Histidin-markiertem LHC Protein eluiert. In der Lösung befindet sich ungefaltetes Protein, teilweise gefaltetes Protein, sowie gefaltete Monomere und Trimere, welche im Gel und auf dem Gradienten detektiert wurden. Die freie Pigmentbande in Gel und Gradient zeigt, dass Chlorophylle, welche nur über Protein an die Säule gebunden sein können, nach der Elution wieder frei in Lösung vorliegen; sie stammen wahrscheinlich von instabilen und falsch gefalteten Komplexen. Jedoch konnte auf dem Saccharosegradienten auch eine pigmentierte Proteinbande isoliert werden, welche nur einen Teil der Pigmente gebunden hatte, und eventuell ein Intermediat bei dem Faltungsprozess darstellt. Ein ähnlicher Komplex, der in seinem Chlorophyllgehalt ebenfalls um die Hälfte reduziert war, wurde auch bei Algen-LHC-II unter bestimmten Rückfaltungsbedingungen gefunden (Meyer et al. 1996). Ein teilweise pigmentiertes Faltungsintermediat bei der Biogenese des LHC-II wurde auf Grund theoretischer Überlegungen zum Importprozess vorgeschlagen (Hooper & Eggink, 1999). Eine Analyse der LHC-II Faltungskinetik lieferte zwei Zeitkonstanten, wobei die Bildung eines pigmentierten Intermediates eine mögliche Interpretation darstellte (Booth & Paulsen, 1996). Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist es jedoch nicht möglich zu entscheiden, ob die gefundene, teilweise pigmentierte LHC-II Spezies (Abschnitt 3.3.1) ein physiologisches Intermediat, oder falsch oder unvollständiges gefaltetes Protein darstellt.

Weiterhin wurden von der Säule LHC Monomere und Trimere als pigmentbindende Komplexe eluiert. Die Bildung der Trimere war abhängig von der Präsenz des Lipids Phosphatidylglycerin. Die Spezifität der Lipidbindung wurde sowohl durch *in vitro* Rekonstitutionsexperimente nachgewiesen (Remy et al., 1982; Nussberger et al., 1993), als auch *in vivo* an Chlamydomonas und Arabidopsis Mutanten, die kein Phosphatidylglycerin synthetisieren und dadurch auch keine LHC-II Trimere bilden (Garnier et al., 1990; Härtel et al. 1998). Das Säuleneluat enthielt im Falle von Wildtyp LHC-II bereits genügend Trimere, um direkt die Bildung von zweidimensionalen Kristallen zu induzieren; diese war abhängig von der Zugabe des Glykolipids Digalactosyl-Diacylglycerin, welche einen Hauptbestandteil der Thylakoidlipide bildet. Bei nativem LHC aus der Pflanze ist diese Zugabe von Lipid nicht nötig, da die Lipide zusammen mit dem Proteinkomplex aufgereinigt werden. Dies stellt

deshalb einen biochemischen Unterschied zwischen rekombinanter und nativer Probe dar. Durch die Prozessierung der elektronenmikroskopischen Bilder der LHC Kristalle konnte nachgewiesen werden, dass die Struktur des rekombinanten LHC der nativen entspricht.

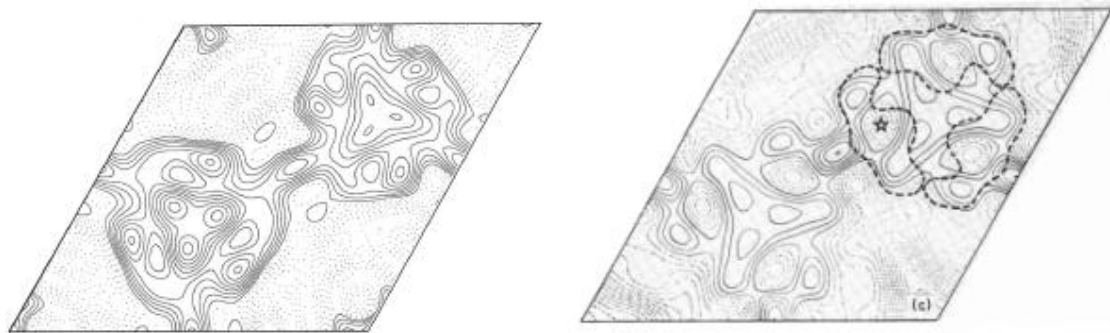


Abb. 54: Projektionskarten der Kristalleinheitszellen von rückgefaltetem LHC-II (links) und nativem LHC-II aus Erbse (rechts, entnommen aus Kühlbrandt, 1988; die schwarz gestrichelten Konturen stellen den Vergleich zur nicht kontrastierten Probe dar). Auflösung 15Å und 16Å. Die Kristalle wurden in beiden Fällen für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Unrallyacetat negativ kontrastiert.

In Abbildung 54 ist ein Vergleich der Einheitszellen der Kristalle gezeigt. Rekombinanter LHC-II (links) war auf der Nickelaaffinitätssäule rekonstituiert worden, während der native (rechts) aus Erbse isoliert wurde. Obwohl der Vergleich nicht auf atomarer Ebene durchgeführt werden konnte, ist die Bildung von Kristallen, welche die gleichen Dimension und Proteinpäckung der Einheitszelle aufweisen, ein sicherer Hinweis auf eine strukturelle Übereinstimmung. Beim Vergleich der beiden Projektionen wird deutlich, dass bei der gegebenen Auflösung auch die Details der Elektronendichte miteinander korrespondieren. Auch bei anderen rekombinanten LHC-II Spezies, die ohne Polyhistidin-Markierung rückgefaltet wurden (Hobe et al., 1994), oder mit Histidin-Markierung in Tabakpflanzen exprimiert wurden (Flachmann & Kühlbrandt, 1996), konnte die Bildung zwei-dimensionaler Kristalle nachgewiesen werden.

In seinem Raumtemperatur-Absorptionsspektrum war der rekombinant hergestellte, trimere LHC-II vom nativen nicht unterscheidbar. Er wies sowohl die charakteristische Rotverschiebung des Chlorophyll *a* Q_y Peaks auf, als auch den typischen, abgesetzten Chlorophyll *b* Seitengipfel. In einem Fluoreszenzspektrum zeigte sich vollständige Energieübertragung von Chl *b* auf die langwelligsten Chl *a* Spezies. In einem Absorptionsspektrum bei tiefen Temperaturen ergaben sich jedoch kleine Unterschiede, besonders in der relativen Höhe der beiden langwelligsten Chl *a* Peaks; insgesamt schien das Spektrum des rekombinanten LHC-II aus etwas breiteren Subbanden zusammengesetzt (siehe Abschnitt 4.6). Eine mögliche Ursache dafür ist in einer etwas heterogeneren Besetzung der Chlorophyllbindetaschen zu suchen, im Fehlen der peripheren Glykolipide, welche im nativen

Komplex mitgereinigt werden, oder auch in einer veränderten Detergenzbindung, da der rekombinante Komplex mit anderen Detergenzien präpariert wird als der native. Insgesamt kann man aber davon ausgehen, dass auch bei 4K das Absorptionsspektrum des rückgefalteten Komplexes mit dem nativen übereinstimmt, da alle Hauptbanden der spektralen Feinstruktur erkennbar sind und bei den selben Wellenlängen liegen.

4.3 Spezifität der Pigmentbindung

4.3.1 Bindungsspezifität für Chl *a* und Chl *b*

Wie im Abschnitt 3.5.1 gezeigt, ist es möglich, LHC-II bei verschiedenen Chl *a/b* Verhältnissen rückzufalten, so dass entsprechend Komplexe mit unterschiedlichem Chlorophyllgehalt gebildet werden. Bei einer detaillierten Analyse solcher Daten lassen sich daraus die Bindungsspezifitäten für Chl *a* und Chl *b* für einzelne Bindungsstellen bestimmen (Stefan Hobe, pers. Mitteilung). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist es möglich, im Extremfall Komplexe zu erzeugen, die ausschließlich Chlorophyll *b* enthalten. Bei diesen waren offensichtlich die Chl *a* Bindungsstellen mit Chl *b* besetzt. Dies wirft die Frage auf, inwieweit die Bindungsstellen im LHC-II überhaupt spezifisch mit Chl *a* oder Chl *b* besetzt sind, und inwieweit eine spezifische Besetzung für die Funktion der Energieübertragung nötig ist.

Bei den Chlorophyllaustauschexperimenten mit Chl *a* und Chl *b* in Abschnitt 3.5.1 konnte gezeigt werden, dass die betroffenen Bindungsstellen eine ca. 10fach höhere Affinität für Chl *a* im Vergleich zu Chl *b* hatten. Eine Bindungsstelle war im Experiment überhaupt nicht mehr für den Austausch zugänglich, sobald sie einmal mit Chl *a* besetzt war. Dies zeigt, dass diese Bindungsstellen im LHC-II unterschiedliche Spezifitäten für Chl *a* oder Chl *b* besitzen und in der Natur wahrscheinlich vorwiegend mit einer Chlorophyll Art besetzt sind. Der Komplex, der ausschließlich mit Chlorophyll *b* rückgefaltete wurde, ist deshalb ein *in vitro* Produkt, welches nur unter bestimmten experimentellen Bedingungen hergestellt werden kann. Diese Interpretation wird durch die Tatsache bestärkt, dass der nur Chl *b*-haltige Komplex ausschließlich bei Verwendung des Säulenprotokolls trimerisiert werden kann. Bei Verwendung des Protokolls der Detergenzfällung/Dialyse ist die Trimerisierung abhängig von der Zugabe von Chl *a* (Rogl et al., 1998). Interessant ist in diesem Zusammenhang, inwieweit der native LHC-II eine Heterogenität aufweist, also welche der Bindungsstellen wahlweise mit Chl *a* oder mit Chl *b* besetzt werden können, bzw. ob dies in der Pflanze überhaupt vorkommt. Da die Faltung *in vivo* generell ein fein abgestimmter Prozess ist, der schonender

erfolgt als *in vitro* in der Präsenz von denaturierenden Agenzien, erscheint eine spezifische Besetzung der Bindungsstellen *in vivo* wahrscheinlich. Auch die Tatsache, dass nativer LHC-II bei einem gegebenen Protokoll immer mit dem gleichen Chl *a/b* Verhältnis isoliert wird, spricht für einen klar definierten Pigmentgehalt. Nur in einer einzigen Untersuchung, in denen Pflanzen mit Intervallbeleuchtung gezüchtet wurden, waren LHC Komplexe mit verschiedenen Chl *a/b* Verhältnissen isoliert worden (Marquardt & Bassi, 1993). Diese waren jedoch nur partiell aufgereinigt worden, und die angegebenen Chlorophyll/Protein Stöchiometrie betrug weniger als 40% des Erwartungswertes von 480 $\mu\text{mol Chl} / \text{g Protein}$ für LHC-II (entspricht 12 Chlorophylle pro 25 kDa Monomer). Dies bedeutet dass die Komplexe in dieser Probe partiell denaturiert waren.

Die Frage nach Schwankungen des Chl *a/b* Verhältnisses des LHC-II *in vivo* ist im Sinne der Funktion des Komplexes äußerst interessant. Da vor kurzem die Chlorophyll *a* Oxigenase kloniert wurde, welche Chl *a* zu Chl *b* oxidiert (Tomitani et al., 1999), könnte durch Überexpression oder Reprimierung dieses Enzyms das Chl *a/b* Verhältnis der Thylakoidmembran verändert werden. Je nachdem, ob das Chl *a/b* Verhältnis der LHC-II Komplexe ebenfalls seinen Wert ändert, könnte man daraus auf spezifische oder unspezifische Chlorophyllbindung schließen. Eine weitere Studie (Walters & Horton, 1999) berichtet von der Isolation von LHC-II mit erhöhtem Chlorophyll *a* Gehalt nach Anzucht der Pflanzen im Schwachlicht. Diese Unterschiede wurden auf die Erhöhte Expression der Lhcb2 Form im Schwachlicht zurückgeführt. Dies würde wiederum bedeuten, dass die Chlorophyllbindung bei einem gegebenen LHC Polypeptid hoch spezifisch ist, sich aber zwischen den einzelnen Isoformen unterscheidet. Ein einfacher Nachweis dieser Hypothese könnte durch die Rückfaltung und den Vergleich der verschiedenen LHC-II Polypeptidformen gelingen.

4.3.2 Bindung von Chlorophyllderivaten

Wie in Abschnitt 3.5.2 dargestellt, wurden verschiedene Chlorophyllderivate darauf hin getestet, ob sie in LHC-II eingebaut werden können. Es wurde nativ isolierter LHC-II mit einem Überschuss an Chlorophyllderivaten inkubiert. Somit sind nicht alle Bindungsstellen frei zugänglich, wie dies bei der Rückfaltung der Fall ist, so dass die Chlorophyllderivate nur an einigen wenigen Bindungsstellen eingebaut wurden. Es zeigte sich, dass diese vorher Chl *a* gebunden hatten. Durch dieses Protokoll konnte z.B. der Chlorophyll *b* Gehalt des LHC-II erhöht werden, wie dies auch aus den Experimenten mit dem rückgefalteten LHC-II erwartet wurde. Es zeigte sich, dass Chlorophyllderivate mit Modifikationen am Porphyringerüst

bereitwillig in die betroffenen Bindungsstellen eingebaut wurden: Beim Chlorophyll *b* ist im Vergleich zu Chlorophyll *a* eine Methylgruppe des Pyrrolrings II (enthält N²², siehe Anhang A) zu Formyl oxidiert, während im 3-Vinyl-Bakteriochlorophyll *a* dieser Ring reduziert ist. Auch das 3-Acetyl-chlorophyll *a*, welches im Pyrrolring I (enthält N²¹) die Acetylgruppe des Bakteriochlorophylls enthält, wurde in den LHC-II Komplex eingebaut. Nur das Bakteriochlorophyll *a* selbst, wo Ring I und II im Vergleich zum Chlorophyll *a* verändert sind, konnte nicht eingebaut werden.

Viel sensibler verhielt sich der LHC-II gegenüber Veränderungen im Zentralatom der Chlorophyllliganden. Sowohl "Chlorophyll" ohne zentrales Mg²⁺ Atom (Phäophytin), als auch die entsprechenden Derivate mit Nickel oder Platin konnten nicht an den LHC-II gebunden werden. Lediglich das Zink-Derivat wurde eingebaut. Eine entscheidende Rolle könnte hierbei der genaue Abstand des Zentralatoms zum Aminosäurenliganden spielen, der die richtige Geometrie für die Komplexbildung dieser Atome ermöglichen muss. Die Rückfaltung von LHC-II mit Zn²⁺ Phäophytin *a* war auch *in vitro* und *in vivo* demonstriert worden (Paulsen et al., 1992; Kuttkat et al., 1997). Das Platin Derivat war ausgewählt worden, um Schwermetallderivate zu erzeugen, die zur Auswertung der Beugungsdaten von drei-dimensionalen Kristallen dienen. Nickel-Chlorophyll wirkt als Quencher, da es einen Weg zur strahlungslosen Energieableitung des angeregten Zustands besitzt. Beim bakteriellen LH1 konnte mit Hilfe von Nickel-Bakteriochlorophyll gezeigt werden (Fiedor et al., 2000), dass die Anregungsenergie über ca. 20 Chlorophyllmoleküle verteilt ist (Excitongröße). Dieses Derivat konnte jedoch weder in den Austauschversuchen, noch bei einer Rückfaltung in den LHC-II inkorporiert werden.

Die relativ hohe Sensitivität von LHC gegenüber dem Zentralatom des Porphyrinliganden dient auch als Bestätigung für die gefundene Spezifität der Mutantenexperimente in Abschnitt 3.6. Auch hier wurde durch die Mutation der Ligand für das Zentralatom entfernt, um die Bindung des entsprechenden Chlorophylls zu verhindern.

Die LHC-II Komplexe mit den neuen Chlorophyllderivaten zeigten interessante spektroskopische Veränderungen (Abschnitt 3.5.2, Abb. 31-34): Durch Einbau des Zn²⁺ Phäophytins *a* wurde ein Teil der Chlorophyll *a* Q_y Absorption leicht in den kürzerwelligen Bereich verschoben. Bei den Derivaten, die dem Bakteriochlorophyll ähnelten, ergab sich eine Verschiebung in den langwelligen Bereich. Der LHC-II mit 3-Vinyl-bakteriochlorophyll hatte eine neue Absorptionsbande im Infraroten erhalten, die vollständig vom Rest der roten Absorptionspeaks getrennt war. Es konnte gezeigt werden, dass Anregungsenergie vom

kurzwelligem Chlorophyll *b* bis auf das sehr langwellige Chlorophyllderivat übertragen wurde. Durch ein Fluoreszenzanregungs-Spektrum wurde untersucht, welche Pigmente Energie auf das 3-Vinyl-bakteriochlorophyll übertragen können (Abb. 34). Das erhaltene Spektrum war identisch mit dem des nativen LHC-II, welches beim langwelligsten Chlorophyll *a* bei 680nm detektiert wird. Da also alle Pigmente genauso Energie auf das infrarote Chlorophyllderivat übertragen können, wie auf das langwelligste Chlorophyll *a* im nativen Komplex, bestätigt dies den spezifischen Einbau dieses Derivates. Die Effizienz der Energieübertragung war jedoch in allen Fällen beim nativen LHC-II am größten: Dies lässt vermuten, dass die Weiterleitung der Anregungsenergie nur bei der natürlichen Besetzung der Bindungsstellen optimal ist und diese im Laufe der Evolution entsprechend optimiert wurde. Ein verzögerter Energietransfer kann zu einer strahlungslosen Löschung der Anregung führen, welcher beispielsweise durch die Carotinoide vermittelt wird. Zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen des Energietransfers dieser Komplexe könnten hier weitere Aufschlüsse geben, um die Energietransferpfade im LHC-II aufzuklären.

Ein Austausch von Chlorophyllmolekülen gegen modifizierte Derivate wurde auch am bakteriellen LH1 Komplex durchgeführt (Lapouge et al., 2000). Hier konnte gezeigt werden, dass eine Bindungsstelle eine starke Präferenz für das nicht natürliche Zn^{2+} Bakteriophäophytin aufweist. Durch die Inkorporation von Chlorophyllderivaten in das bakterielle Reaktionszentrum von *Rhodobakter sphaeroides* veränderten sich die photochemische Kinetiken, was auf eine Verschiebung der Redoxpotentiale zurückgeführt wurde (Meyer et al., 1996). Kürzlich konnte auch die Inkorporation von modifizierten Chlorophyllen in das photosynthetische Reaktionszentrum II der höheren Pflanzen nachgewiesen werden (Gall et al., 1998). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigen erstmals einen Pigment austausch auch am pflanzlichen LHC-II.

4.3.3 Carotinoide im LHC-II: Bindungsspezifität, Lokalisation, Funktion

Aus nativem LHC-II lassen sich verschiedene Carotinoide isolieren, nämlich 2 Luteine, ca. 1 Neoxanthin und substöchiometrischen an Violaxanthin pro Monomer. Die Bindungseigenschaften wurden durch Rückfaltungsexperimente mit nur jeweils einer Spezies untersucht (Abschnitt 3.5.3). Es konnte gezeigt werden, dass sich hierbei die Bindungsspezifität für Chlorophyll nicht änderte. Ein besonderes Augenmerk lag auf der Frage, welche der Einzelcarotinoid-Komplexe noch in der Lage waren, Trimere zu bilden: dies war nur bei Lutein und Violaxanthin der Fall, nicht jedoch bei Neoxanthin und Zeaxanthin.

In der elektronenkristallographischen Struktur sind im Zentrum zwei längliche Elektronendichten sichtbar, die als zwei gebundene Luteine angenommen werden. Sie nehmen durch ihre zentrale und überkreuzte Position eine wichtige Rolle für die Stabilisierung des Komplexes ein. Die essentielle Rolle, die das Lutein bei den Rückfaltungs- und Trimerisierungsexperimenten zeigte, stimmt mit dieser Hypothese überein. Anstelle einer Proteinquantifizierung, die aus methodischen Gründen nicht möglich war, wurden zwei Luteine als interner Standard für die Quantifizierung der LHC-II Monomere angenommen. Dies erwies sich als stabiler und zuverlässiger Parameter und lässt darauf schließen, dass die Luteine stabil in den beiden zentralen Bindungsstellen gefalteter LHC-II Komplexe verankert sind. Bei Croce et al. (1999b) wurde in einem sehr ähnlichen Rückfaltungsexperiment am LHC-II die gleiche Schlussfolgerung gezogen. Eine weitaus genauere Untersuchung der Bindungsspezifität findet sich bei Hobe et al. (2000): In Rückfaltungsexperimenten wurde die Besetzung der drei Carotinoidbindungsstellen des LHC-II bestimmt. In Konkurrenzexperimenten wurde gezeigt, dass die Carotinoide Lutein und Neoxanthin mit 200facher bzw. 25facher Präferenz in ihre jeweiligen Bindungsstellen eingebaut werden. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass Lutein mit starker Präferenz in zwei Bindungsstellen bindet, welches vermutlich die beiden zentralen, in der elektronenkristallographischen Struktur sichtbaren sind. Eine direkte und unabhängige Bestimmung des Winkels der beiden Luteine aus spektroskopischen Daten lieferte einen Winkel mit der Membrannormalen von 51° (Gruszecki et al., 1999). Dies stimmt mit dem Winkel der zentralen Carotinoide aus der Kristallstruktur überein (Kühlbrandt et al., 1994).

Aus den Bindungsdaten von Hobe et al. (2000) kann weiterhin entnommen werden, dass Violaxanthin vorwiegend in die "Neoxanthin Bindungsstelle" eingebaut wird; dies wird durch die Rückfaltungsexperimente mit den LHC-II Mutanten bestätigt (Abschnitt 3.6), die neben einem reduzierten Neoxanthingehalt auch einen reduzierten Violaxanthingehalt aufwiesen. Diese Beobachtung wird auch bei den LHC-II Mutanten von Remelli et al. (1999) gemacht, jedoch waren dort alle Mutanten in ihrem Violaxanthingehalt leicht reduziert. Bei Croce et al. (1999b) wird dagegen vorgeschlagen, dass Violaxanthin mit in die zentralen "Lutein Bindungsstellen" eingebaut ist. Da in den Einzelcarotinoidkomplexen (Abschnitt 3.5.3) neben Lutein das Violaxanthin als einziges Carotinoid zur Faltung von Trimeren führt, muss gefolgert werden, dass Violaxanthin Lutein in den zentralen Bindungsstellen tatsächlich unter bestimmten Bedingungen *in vitro* ersetzen kann. Eine weitere Hypothese wurde schließlich von Ruban et al. (1999) vorgestellt, bei der Violaxanthin in einer vierten Bindungsstelle sitzt. Es ist dort nur lose gebunden, und deshalb in "normalen LHC-II

Präparationen” nur substöchiometrisch vorhanden. Die Autoren stellen eine neue Reinigungsmethode vor, mit der Violaxanthin stöchiometrisch mit einem Molekül pro Monomer LHC-II isoliert werden kann. In spektroskopischen Untersuchungen wurde gefunden, dass Violaxanthin eine deutlich andere Orientierung als Lutein einnimmt, nämlich eine fast parallele Orientierung zur Membran (Gruszecki et al., 1999). Ohne die Unterschiede im Detail zu diskutieren, scheint klar zu sein, dass weitere experimentelle Daten nötig sind, um die Frage der Lokalisation des Violaxanthin endgültig zu klären. Da Violaxanthin ein wichtiges Carotinoid des Xantophyllcyclus ist, scheint eine periphere Position am LHC-II wahrscheinlich, damit es für De-Epoxidasen oder für einen Austausch gegen Zeaxanthin zugänglich ist: Im Xantophyllcyclus wird Violaxanthin bei starker Lichteinstrahlung zu Zeaxanthin de-epoxidiert. Dies bewirkt eine Erhöhung der nicht-photochemischen Löschung (Quenching) angeregter Energiezustände des Photosyntheseapparates, und soll somit die photosynthetischen Reaktionszentren vor Beschädigung durch Überanregung schützen. Ein möglicher Mechanismus dafür liegt in der Höhe der Energieniveaus der Carotinoide relativ zum Chlorophyll *a* begründet (Frank et al., 1994): Während das Violaxanthin mit einem höheren Energieniveau die Energie auf das Chlorophyll überträgt, wirkt Zeaxanthin mit einem niedrigerem Energieniveau als Quencher für Chlorophyll. Messungen der Fluoreszenzlöschung am LHC-II widersprechen dieser Theorie jedoch (Ruban et al., 1998). Eine De-Epoxidierung der Carotinoide wird sowohl beim LHC-II, bei den minoren LHC Komplexen, als auch direkt an den Photosystemen gefunden (Färber et al., 1997). Kürzlich konnte an Arabidopsis Mutanten gezeigt werden, dass das PS-II assoziierte Lichtsammelprotein PsbS (Funk et al., 1994) direkt mit dem Messparameter der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung korreliert (Li et al., 2000): Pflanzen ohne PsbS zeigten eine starke Reduktion des Messparameters der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung. Damit stellt sich die Frage, welche Rolle alle anderen Lichtsammelproteine spielen, die den größten Teil der Xantophyllcyclus-Carotinoide binden. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die Auswirkung der De-Epoxidierung dieser Carotinoid Population nur schlecht im Messparameter der Fluoreszenzlöschung erfasst ist. Da am isolierten LHC-II, welcher bis zu 50% des Thylakoidchlorophylls stellt (Peter & Thornber, 1991), eine carotinoidabhängige Löschung der Anregungsenergie gezeigt wurde (Ruban et al., 1998), sind wahrscheinlich alle LHC Proteine an der Dissipation von überschüssiger Energie beteiligt. Dass der Effekt bei PsbS am besten messbar ist, könnte dadurch bedingt sein, dass dieses Protein in engster Nachbarschaft zum photosynthetischen Reaktionszentrum lokalisiert ist.

Neoxanthin ist stöchiometrisch mit ungefähr einem Molekül pro Monomer im LHC-II gebunden. Bis vor kurzem war diesem Carotinoid jedoch keine spezifische Funktion zugeordnet worden. Bei Croce et al. (1999a) wurde gefunden, dass die Absorptionsschulter des LHC-II Komplexes bei 650nm von der Bindung des Carotinoids Neoxanthin abhängt. Das gleiche Ergebnis ergab sich aus den Experimenten der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 3.5.3). Da Carotinoide nicht im Bereich von 650nm absorbieren, ändert sich bei diesem Versuch offenbar die Umgebung der Chlorophyll *b* Moleküle in einem Maße, dass der typische Nebengipfel des LHC-II Spektrums verschwindet, wenn die Neoxanthinbindungsstelle nicht besetzt ist. Dies lässt auf eine enge räumliche Nähe des Neoxanthins zu einigen Chlorophyll *b* Molekülen schließen. Das Nebenmaximum des LHC-II Spektrums bei 650nm wird auch dann beobachtet, wenn die "Neoxanthin Bindungsstelle" mit Lutein oder Violaxanthin besetzt ist (Abb. 36, Abschnitt 3.5.3); dies zeigte sich bei den Trimeren, welche 3 Luteine oder 3 Violaxanthine gebunden hatten. Bei den Monomeren mit jeweils nur einem Carotinoid blieb diese Bindungsstelle leer, und das Chl *b* Maximum bei 650nm war nur als schwächere Schulter ausgeprägt. Bei der Faltung mit Neoxanthin als einzigem Carotinoid wurde die "Neoxanthin Bindungsstelle" natürlich auch bei den Monomeren besetzt, und das Chl *b* Maximum hatte die gleiche Höhe wie beim Wildtyp. Die spezifische Rolle des Carotinoids Neoxanthin in dieser Bindungsstelle bleibt damit offen, da in den Versuchen gezeigt wurde, dass auch Lutein oder Violaxanthin die Rolle der spektralen Chlorophyll *b* Modulation übernehmen können. Es ist denkbar, dass die Konformation des Neoxanthins eine optimale Energieübertragung zu den Chlorophyllmolekülen entweder als Lichtsammler oder als Chlorophyll-Triplett Quencher ermöglicht. Diese Hypothese könnte durch kinetische Messungen der Energieübertragung überprüft werden. Für die Lokalisation des Neoxanthins, für das in der elektronenkristallographischen Struktur keine Elektronendichte zugeordnet wurde, geben einige Chlorophyllmutanten Aufschluss, welche in ihrem Neoxanthingehalt reduziert sind (Abschnitt 3.6.2). Diese legen nahe, dass das Neoxanthin in Nachbarschaft zur Helix C, und in der Nähe von Chlorophyll *b6* und *b5* lokalisiert ist. Dies stimmt hervorragend mit den Daten aus mutiertem Mais LHC-II überein (Croce et al., 1999a). Dort wurde weiterhin der Winkel des Neoxanthindipols zur Membrannormalen aus Linear-Dichroismus Messungen mit 57° bestimmt, und daraus sogar ein Strukturmodell erstellt. Im Gegensatz dazu findet sich jedoch in der Arbeit von Gruszecki ein Winkel von 64° (1999). Obwohl beide Arbeiten darin übereinstimmen, dass Neoxanthin einen ähnlichen Winkel wie die Luteine einnimmt, können nur weitere experimentelle Strukturdaten die Frage der genauen Lokalisation des Neoxanthin klären.

Bei verschiedenen Pflanzen sind Mutanten bekannt, welche in bestimmten Carotinoidsynthesewegen Defekte aufweisen. In Grünalgen wurde gezeigt, dass in Lutein-freien Mutanten keine stabilen LHC-II Komplexe gebildet werden (Heinze et al., 1997; Niyogi et al., 1997). Dies bestätigt die wichtige strukturelle Rolle dieses Xantophylls im LHC-II. Bei einer entsprechenden Mutante in Arabidopsis wurde jedoch gefunden, dass Lutein offenbar für das photosynthetische Wachstum der Pflanzen entbehrlich ist (Pogson et al., 1996). Eine Isolation von LHC-II ist jedoch aus diesen Pflanzen nicht möglich (Heiko Lokstein, persönliche Mitteilung). Arabidopsismutanten, welche in einem Schritt der β -Carotinidsynthese blockiert sind, bilden isolierbare LHC-II Komplexe, die Lutein und Zeaxanthin, jedoch kein Neoxanthin und Violaxanthin enthalten (Connelly et al., 1997a). Insgesamt bestätigen diese Arbeiten die Annahme von Lutein als essentielles Carotinoid und seine zentrale Position im LHC-II Komplex, wie sie im Strukturmodell postuliert wurde.

4.4 Chlorophyllzuordnung durch mutierten LHC-II

Durch die Expression des LHC Polypeptids in *E. coli* war es in einfacher Weise möglich, Mutationen in die Aminosäurekette einzuführen. Diese wurden so gewählt, dass aus der Struktur bekannte, Chlorophyll-bindende Aminosäureseitenketten entfernt wurden, und die entsprechenden Histidine, Glutamine, Asparagine und Glutamate zu Alanin oder Leucin mutiert wurden. Das zentrale Magnesiumion des Chlorophylls ist fünffach koordiniert (Scheer, 1991): vier Liganden werden von den Stickstoffatomen des Porphyrinrings gebildet, der fünfte wird von der Aminosäureseitenkette des Proteins gestellt (Abb. 55).

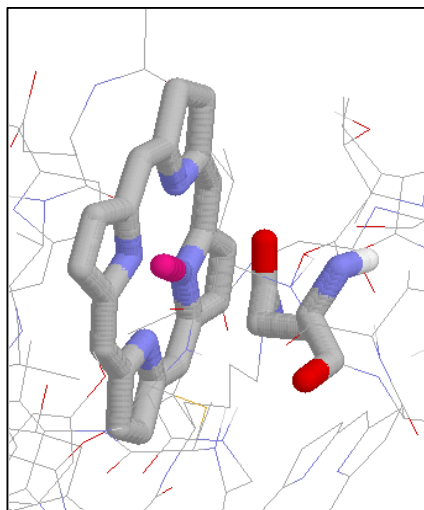


Abb. 55: Ausschnitt aus der LHC-II Struktur: Das zentrale Mg^{++} Atom (pink) des Chlorophylls *a2* wird von den Stickstoffatomen des Porphyrinrings und der Aminosäureseitenkette Asn183 koordiniert. Dargestellt durch das Programm rasmol.

Da aus der Struktur acht dieser Seitenketten bekannt waren, sollte die Bindung der jeweiligen Chlorophyllmoleküle durch Entfernung dieses Liganden verhindert werden. Der fünfte Ligand des Chlorophylls *a6* wird vom Sauerstoffatom des Polypeptidrückgrates des Glycin 78 gebildet, der das zentrale Mg^{2+} Atom des Chlorophylls vermutlich über ein Wassermolekül bindet. Dieser konnte nicht entfernt werden, stattdessen wurden große hydrophobe Reste an dieser Stelle eingeführt, um das Chlorophyll aus seiner Bindetasche zu verdrängen. Diese Mutante erwies sich jedoch als äußerst instabil. Offenbar ist es für die Stabilität und die korrekte Faltung des Proteins notwendig, dass sich an der Position 78 ein Glycin befindet: Wahrscheinlich wird die Faltung sterisch behindert, wenn die Aminosäure an dieser Stelle eine Seitenkette trägt. Bei den Chlorophyllen *b1*, *b2* und *a7* sind aus der Struktur keine Aminosäuren bekannt, welche als fünfter Ligand in Frage kämen, so dass sie nicht untersucht wurden. Bei allen anderen Mutationen (Chl *a1*, *a2*, *a3*, *a4*, *a5*, *b3*, *b5*, *b6*) zeigte sich, dass die rückgefalteten Komplexe tatsächlich in ihrem Pigmentgehalt verändert waren, und dass im Rahmen des experimentellen Messfehlers nur jeweils ein Chlorophyllmolekül pro LHC Monomer verloren wurde.

4.4.1 Trimerisierung der Mutanten

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation konnten die LHC-II Komplexe getrennt nach Monomeren und Trimeren isoliert werden. Die Mutanten, welche die Bindungsstellen für Chlorophyll *a4*, *a5* und *a6* blockiert hatten, bildeten keine Trimere mehr. Im Falle von Chl *a6* war dies wahrscheinlich auf die verminderte Stabilität des gesamten Komplexes zurückzuführen (siehe oben). Bei einer Mutation der Bindungsstelle für Chl *a5* ist aus der Struktur ersichtlich, dass Chl *a5* an einem Trimerkontakt beteiligt ist, so dass das Fehlen von Trimeren in dieser Mutante gut erklärbar ist. Weitere Mutanten (H68L und H68F) an dieser Bindungsstelle zeigten, dass auch bei Faltung *in vivo* keine Trimere gebildet wurden (Yang et al., 1999). Das Chl *a4* bildet keinen solchen Trimerkontakt, jedoch könnte ein indirekter Effekt auf das benachbarte Chl *a5* die Trimerisierung inhibieren. Außerdem ist die zugehörige Aminosäure Glu65 an einer wichtigen internen Salzbrücke zwischen Helix A und B im Protein beteiligt. Ein Fehlen dieses Kontaktes könnte die Bildung stabiler Trimere verhindern oder eine Konformation des Monomers favorisieren, die nicht in der Lage ist, Trimere zu bilden. Mutationen an der ähnlichen Salzbrücke Glu180 und an der intrahelicalen Salzbrücke Glu139, beeinflussen die Trimerisierung jedoch nicht (Bindungsstellen für Chl *a1* und *b5*). Die rein monomere Form dieser Komplexe wurde an jeweils zwei unabhängigen Mutanten nachgewiesen (E65A und E65L), bei denen jeweils zwei verschiedene neue Aminosäuren

eingeführt wurden. In einer frühen Arbeit wurde an der LHC-II Mutante EK1 festgestellt (Kohorn & Tobin, 1987), dass ein Austausch eines Glutamates zu Lysin zu stabilen Komplexen führt, deren Akkumulation *in vivo* jedoch stark reduziert war. In Kenntnis der Struktur kann nun interpretiert werden, dass das betreffende Glutamat dem Glu 83 des Erbsen LHC entspricht und wahrscheinlich eine Salzbrücke mit Arg 87 bildet (Abstand < 4Å); hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine Chl-bindende Aminosäure. Die anderen Mutationen dieser Arbeit liegen im Gegensatz zu der damaligen Vermutung nicht in den Transmembranhelices.

4.4.2 Quantifizierung der Pigmente und des Polypeptids

Die Banden aus dem Saccharose-Dichtegradienten wurden auf ihren Pigmentgehalt analysiert, um eine Zuordnung der Chlorophylle zu den jeweiligen Bindungsstellen vorzunehmen. Um mit verdünnten Lösungen zuverlässige Messwerte zu erhalten, wurde die Analyse nicht photometrisch, sondern durch Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorgenommen. Als zuverlässigster Messparameter erwies sich hier das Chlorophyll *a/b* Verhältnis (Tabelle 8). Da beide Chlorophyllarten chemisch sehr ähnlich sind und im selben HPLC Lauf bestimmt wurden, heben sich hier alle systematischen Fehler der Analyse und der Probenvorbereitung auf. Ähnliches gilt für die Carotinoide, die ebenfalls im gleichen HPLC Lauf bestimmt wurden (Abb. 28). Versuche, auch den Polypeptidgehalt durch Umkehrphasen HPLC zu bestimmen, nach Möglichkeit in einem Lauf mit den Pigmenten, waren trotz Verwendung verschiedenen Säulentypen und Laufmitteln nicht erfolgreich. Mit der Entwicklung neuer HPLC-Methoden scheint dieses Ziel jedoch mittlerweile wieder in greifbarer Nähe zu sein (Zolla et al., 1999; Damm & Green, 1994). Um den absoluten Pigmentgehalt zu bestimmen, also die Anzahl der gebundenen Chlorophylle und Carotinoide pro LHC Monomer, ist es nötig, eine entsprechend genaue Bestimmung des Polypeptidgehalts der Probe durchzuführen. Für die Detektion des Verlustes eines Chlorophyllmoleküls von den 12 gebundenen ist eine Messgenauigkeit von mindestens 4% nötig, da aus den beiden Messwerten für Chlorophyll und Polypeptid ein Quotient gebildet wird. Mit colorimetrischen Proteintests ist dieser Wert nicht oder nur mit unverhältnismäßig hohem Aufwand zu erreichen, da sich die starke Hydrophobizität des LHC-II und die Präsenz von Detergenzien und Pigmenten negativ auf die experimentelle Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit dieser Tests auswirken. Als Alternative bietet sich die Verwendung eines internen Standards, nämlich des Luteingehalts an, wobei zwei Moleküle Lutein pro LHC-II angenommen werden. Da die Luteine eine wichtige strukturelle Position im LHC-II einnehmen, ist die Annahme

gerechtfertigt, dass der Gehalt an Lutein pro LHC-II Monomer konstant sein sollte und nur wenig von den jeweiligen Bedingungen eines individuellen Faltungsexperiments abhängt. Die gleichzeitige Bestimmung von Lutein und Chlorophyll in einem HPLC-Lauf schließt außerdem Messungenauigkeiten durch Pipettierfehler aus. Ein weiterer Hinweis für die Zuverlässigkeit von Lutein als interner Standard ist die Tatsache, dass die Verhältnisse der Carotinoide untereinander bei der Mehrzahl der Mutanten konstant waren. Selbst bei denjenigen, die selektiv Neoxanthin und Violaxanthin verloren hatten, wurden bei der Verwendung von Lutein als internem Standard sinnvolle Chlorophyllwerte gefunden. Eine Reduzierung des Luteingehalts bei den Mutanten würde die darauf bezogenen Chlorophyllwerte stark erhöhen – dies wurde nicht gefunden. Trotzdem ist bei den auf Lutein standardisierten Werten eine relativ hohe statistische Schwankung feststellbar. Dies zeigt, dass die Werte nahe an den Grenzen der Messgenauigkeit der Analyseverfahren liegen.

4.4.3 Zuordnung der Chlorophyll-Bindestellen

Bei der Pigmentanalyse der Trimere wurde gefunden, dass von den sechs untersuchten Spezies fünf mit der früheren Chl *a* – Chl *b* Zuordnung übereinstimmten. Nur bei der Bindungsstelle des Chl *b3* (Mutante H212A) zeigte sich, dass dort in Wirklichkeit Chlorophyll *a* gebunden sein muss. Dieses Chlorophyll ist außerdem das einzige, dessen Ligand nicht im Bereich der Transmembranhelices liegt, sondern in der amphipathischen, membranassoziierten Helix D.

Die trimeren Spezies stellen intakte LHC-Komplexe dar, die sich am besten für die biochemische Analyse der Mutanten eigneten. Sie wiesen nicht nur den nativen oligomeren Zustand des LHC-II auf, sondern waren auch in ihrem Chlorophyllgehalt dem nativ isolierten LHC am ähnlichsten. Bei den Monomeren aus dem Saccharosegradienten wurde hingegen ein unspezifischer Verlust von ca. einem Chlorophyll *b* festgestellt. Wurden die Daten der mutierten Monomere mit dem Wildtyp Monomer verglichen, so stimmten diese bezüglich des Verlustes von Chlorophyll *a* oder *b* mit den Trimeren überein. Der geringere Chlorophyll *b* Gehalt der Monomere könnte deshalb auf ein peripher gebundenes Pigmentmolekül zurückgeführt werden. Als weitere Möglichkeit muss in Betracht gezogen werden, dass jeweils in geringem Maße mehrere oder alle Bindungsstellen zu dem Effekt beitragen. Die Isolation der Monomere über ein schwach denaturierendes Nativgel stellt eine weniger schonende Methode zur Isolierung der LHC Komplexe dar. Hier gehen im Vergleich zu den trimeren Komplexen unspezifisch ca. zwei Chlorophyll *a* Moleküle verloren. Diese Proteine wurden zu Referenzzwecken zusätzlich nach der Detergenzaustauschmethode rückgefaltet.

Auch hier ergab sich in den meisten Fällen eine Übereinstimmung mit den Daten der Trimere. Nur die Mutanten E65A (Chl *a4*) und E139A (Chl *b5*) zeigten entgegengesetzte Tendenzen im Vergleich zu den Trimeren; da die Werte jedoch innerhalb der statistischen Standardabweichung lagen, ist dies wahrscheinlich auf Messungenauigkeiten zurückzuführen.

Bei den Mutanten der Chlorophyllbindestellen für Chl *a4*, *a5* und *a6* wurden nur gelegentlich schwache Trimerbanden beobachtet. Es zeigte sich im Falle der Mutanten LG77/78VF bzw. G78I (Chl *a6*), dass hier Chlorophyll *b* verloren ging. Es fehlte jedoch mehr als ein Chlorophyll *b*, außerdem war wie bei der Mutante Q131A (Chl *b6*) der Gehalt an Neoxanthin reduziert. Da Chlorophyll *a6* und *b6* benachbart sind, wäre es möglich, dass Chl *a6* und *b6* einen Chlorophyll *b* Cluster bilden, welcher mit Neoxanthin assoziiert ist. Die Chl *a6* Bindestelle sollte dann einem Chl *b* zugeordnet werden. Außerdem ist in dieser Region weiterhin das Chl *a7* gebunden, für das kein Aminosäureligand in der Struktur identifiziert werden konnte. Jedoch war bereits dort vorgeschlagen worden (Kühlbrandt et al., 1994), dass es sich eventuell auch um ein Chl *b* handeln könnte. Auf Grund der hohen Instabilität der Mutante LG77/78VF sollte diese Zuordnung aus den biochemischen Daten nur als eine spekulative Hypothese aufgefasst werden.

Viel klarer war der Fall bei der Mutante H68A bzw. H68L (Chl *a5*): Sowohl Trimere als auch Monomere aus Gradient oder Gel ergaben den Verlust von Chlorophyll *a*, das Tieftemperaturspektrum der Monomere zeigte den Verlust einer spektralen Chlorophyll *a* Bande. Bei der Mutante E65A bzw. E65L (Chl *a4*), bei der eine interhelicale Salzbrücke unterbrochen war, ergaben die gelegentlichen Trimere und die Monomere aus dem Gradienten den Verlust eines Chlorophylls *b*. Dies bestätigte sich nicht durch die Analyse der aus dem Gel isolierten Monomere. Auch das Spektrum war so stark verändert, dass es nicht im Sinne von Chl *a* oder *b* Verlust interpretiert werden konnte. Obwohl also gute Hinweise für den Wechsel der Chlorophyllzuordnung an dieser Stelle vorliegen, sollten hierzu weitere Versuche durchgeführt werden. Eine Zusammenfassung der Chlorophyllbindungsdaten ist in Tabelle 12 dargestellt.

Bei der Zuordnung der Bindungsstellen aus der Pigmentanalyse der rückgefalteten Mutanten sollten folgende mögliche Störfaktoren berücksichtigt werden:

a.) Einige Bindungsstellen könnten zu einem geringen Teil gemischt mit Chl *a* und Chl *b* besetzt sein. Eine unspezifische Chl *a/b* Affinität war bereits für das Lhcb4 Protein vorgeschlagen worden (Bassi et al., 1999). Die spektroskopischen Daten aber zeigen

(Abschnitt 3.6.3), dass dies bei den hier verwendeten Mutanten offenbar nicht von Bedeutung ist.

b.) Eine mutierte Bindungsstelle einer rückgefalteten LHC Population könnte teilweise besetzt sein, da nur der Ligand für das Mg^{2+} Atom entfernt wurde, der Rest der Bindungstasche aber noch vorhanden ist, um Chl mit geringer Affinität zu binden. In den Chlorophyllaustauschexperimenten konnte jedoch gezeigt werden (Abschnitt 3.5.2), dass die Bindung eines Chlorophyllmoleküls zu einem großen Teil durch die fünffache Koordination des Zentralatoms des Porphyrins vermittelt wird. Das heißt also, dass der Aminosäurerest, der den fünften Koordinationspartner stellt, einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität der Chl Bindung hat.

c.) Benachbarte Bindungsstellen können sich gegenseitig beeinflussen, so dass auch die Bindung eines benachbarten Chlorophyllmoleküls reduziert ist. Hierzu gibt es Hinweise für die instabile Mutante LG77/78VF betreffend den oben beschriebenen Chlorophyllcluster aus Chl *b6*, *a6* und *a7*. Die spektroskopischen Daten der Mutante mit dem geringsten Chl *a/b* Verhältnis Q197L deuten ebenfalls an, dass das Chl *a3* das benachbarte Chl *b3* in seiner Bindung, jedoch zumindest in seinen spektroskopischen Eigenschaften beeinflusst.

Trotz all dieser Faktoren konnten die Daten für den Chlorophyllgehalt der Mutanten sinnvoll interpretiert werden, es ergab sich der Verlust von ungefähr einem Chlorophyll bei einer gegebenen Mutante.

4.4.4 Bindungsstelle für Neoxanthin

Drei der Mutanten waren nicht nur in ihrem Chlorophyllgehalt, sondern auch in ihrem Gehalt an Violaxanthin und Neoxanthin reduziert. Dies zeigt, dass die Bindung von verschiedenen Pigmenten gekoppelt sein kann, und der Wegfall eines Pigments auch Einfluss auf das benachbarte Pigment haben kann, in diesem Fall auf das Carotinoid. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Bindungsstellen des Chl *b5* (E139A), *b6* (Q131A) und *a6* (LG77/78VF) an die Bindung von Neoxanthin/Violaxanthin gekoppelt ist. Der Gehalt dieser Carotinoidie war in den entsprechenden Mutanten um ca. die Hälfte reduziert. Die Stellen *b5* und *b6* wurden auch in den LHC-II Mutanten von Croce et al. (1999a) identifiziert. Erstaunlicherweise wurde in der Chl *b6* Mutante von Yang et al. (1999; und Harald Paulsen, persönliche Mitteilung) keine Reduktion des Neoxanthins gefunden. Dies zeigt also, dass bei der Beeinflussung der benachbarten Pigmentbindungsstellen auch die Art der Mutation eine Rolle spielt, da in dieser Arbeit die Mutanten Q131S und Q131E untersucht wurden. Beim

verwandten LHC Komplex Lhcb4 (CP29) wurde ebenfalls die Kopplung der Chlorophyllmoleküle *b5* und *b6* an den Neoxanthingehalt beobachtet (Bassi et al., 1999).

Durch die Positionen von Chl *b5* und Chl *b6* kann die Lokalisation der Neoxanthinbindungsstelle, die nicht in der Struktur sichtbar war, eingegrenzt werden. Diese befindet sich demnach nahe der Helix C und in Nachbarschaft dieser Chlorophyll *b* Moleküle. Daraus ergibt sich eine plausible Erklärung für einen umstrittenen spektroskopischen Befund, bei dem Energieübertragung von Carotinoid zu Chl *b* gemessen wurde (Connelly et al., 1997), während andere eine Übertragung zu Chl *a* gefunden hatten (Peterman et al., 1997). Die räumliche Nähe von Chl *a* zu den zentralen Carotinoiden war der Ausgangspunkt für Zuordnung der Chl *a* Moleküle. Dementsprechend sollte auch Energieübertragung von Lutein zu Chl *a* messbar sein. Das dritte Carotinoid, welches in der Struktur nicht sichtbar ist, war bei dieser Überlegung nicht berücksichtigt worden. Die Energieübertragung von Carotinoid auf Chl *b* könnte deshalb durch die Nachbarschaft von Neoxanthin zu Chl *b5* und Chl *b6* erklärt werden.

4.4.5 Vergleich mit anderen Arbeiten

Da die Rückfaltung von LHC-II Mutanten auch von zwei anderen Arbeitsgruppen durchgeführt wurde, außerdem eine ähnliche Studie über das verwandte Lhcb4 (CP29) Protein existiert, liegt es nahe, die Ergebnisse miteinander zu vergleichen (Tabelle 12): Alle Arbeiten am LHC-II wurden an der Lhcb1 Form durchgeführt. Das Protein aus dieser Arbeit ist im Prinzip mit dem aus Arbeit von Yang et al. identisch. In der vorliegenden Arbeit war das native Protein um sechs Histidine verlängert wurde, während bei Yang et al. zwei Aminosäuren nahe des N-Terminus verändert waren. Um die Ergebnisse sinnvoll vergleichen zu können, ist es außerdem wichtig, die Unterschiede in den Rückfaltungsprotokollen herauszuarbeiten: In der vorliegenden Arbeit wurde der LHC-II auf einer Nickel-Affinitätssäule mit dem nativen Chl *a/b* Verhältnis von 1.4 in der Rekonstitutionsmischung gefaltet, die rückgefalteten Trimere hatten dann ein Chl *a/b* Verhältnis von 1.2. Bei Yang et al. wurde eine Faltung von Monomeren mittels Detergenzwechsel erzielt (siehe Abschnitt 2.5.1), das Chl *a/b* Verhältnis in der Rekonstitutionsmischung betrug entweder 1.0 oder 2.0. Die Aufreinigung erfolgte durch Nativgel oder Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation. Für den Vergleich in Tabelle 12 wurden die Daten aus den Dichtegradienten mit höheren Chl *a/b* Verhältnis herangezogen, da die entstehenden LHC Monomere mit ihrem Chl *a/b* Verhältnis von 1.3 dem nativen LHC-II am nächsten kamen. Bei Remelli et al. hatten die rückgefalteten Monomere ein Chl *a/b* Verhältnis von 1.4, wobei die Faltung bei einem

Chl-*a/b* Verhältnis von 2.3 erfolgte. Die Faltung wurde durch Einfrier- und Auftauzyklen in Gegenwart des Detergenz Lithiumdodecylsulfat in Kombination mit dem Detergenzwechselprotokoll erzielt, die Reinigung der Komplexe erfolgte durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation, anschließender Ionenaustauschchromatographie oder Isoelektrischer Fokussierung und schließlich einer Glyceringradienten-Zentrifugation.

Die Pigmentbestimmung erfolgte in der vorliegenden Arbeit und bei Yang et al. durch HPLC Analyse, die Anzahl der gebunden Chlorophylle wurde unter der Annahme von 2 gebundenen Luteinen pro monomeren Komplex errechnet. In beiden Arbeiten unterliegen die Daten deutlichen statistischen Schwankungen. Für die Erstellung der Tabelle 12 wurde deshalb immer die wahrscheinlichsten Veränderungen ganzzahliger Bindestellen im Komplex herangezogen: Eine Veränderung von beispielsweise -0.7 Chl *a* und +0.3 Chl *b* wurde als Verlust eines Chl *a* Moleküls gedeutet, ebenso wie eine Veränderung von -1.5 Chl *a* und -0.5 Chl *b*. Bei Remelli et al. wurden die Chlorophylldaten mit der Annahme von 1.68 Molekülen Lutein pro monomeren Komplex errechnet, da die Autoren davon ausgehen, dass die Luteinbindestelle teilweise mit Violaxanthin besetzt ist. Da der Gehalt an Violaxanthin bei verschiedenen Mutanten stark schwankt, bleibt diese Annahme fragwürdig (siehe Kapitel 4.3.3). Die Pigmentanalyse wurde durch die rechnerische Anpassung von Chl *a* und Chl *b* Spektren an das Spektrum eines Acetonextrakts der jeweiligen Mutante durchgeführt. Die Autoren gehen davon aus, in Kombination mit einem colorimetrischen Proteintest bis zu 0.5 Moleküle Chlorophyll pro Komplex exakt bestimmen zu können. Dies scheint jedoch zweifelhaft in Anbetracht der Tatsache, dass nur drei Messungen durchgeführt wurden und keine Angaben zur statistischen Standardabweichung gemacht wurden.

Chloro- phyll	LHC-II Trimere, Erbse, Diese Arbeit	LHC-II Monomere, Erbse, Yang et al., 1999	LHC-II Monomere, Mais, Remelli et al., 1999	Lhcb4 (CP29) Monomere, Mais, Bassi et al., 1999
<i>a4</i>	E65A 1Chl <i>b</i>	E65Q+H68L(Chl <i>a</i> 5) 1 Chl <i>a</i>	E65L/R185L 0.3 Chl <i>b</i>	E111V/R218L 1Chl <i>a</i>
<i>a5</i>	H68A 1Chl <i>a</i>	H68L & H68F 1Chl <i>a</i> & >1Chl <i>a</i>	H68I 1Chl <i>a</i>	H114F 1Chl <i>a</i>
<i>a6</i>	LG77/78VF 3Chl <i>b</i>	-	P82V 0Chl	-
<i>b5</i>	E139A 1Chl <i>b</i>	-	E139L/R142L 2-3 Chl <i>b</i>	R177L/E174V Keine Rek.
<i>a1</i>	E180A 1Chl <i>a</i>	-	E180V/R70I >1Chl <i>a</i>	E213V/R116L Keine Rek.
<i>a3</i>	Q197L >1Chl <i>a</i>	Q197E & Q197S 1Chl <i>a</i> & 1Chl <i>a</i>	Q197V 0.5Chl <i>a</i> , 0.5Chl <i>b</i>	Q230L 0.7Chl <i>a</i> , 0.3Chl <i>b</i>
<i>b3</i>	H212A 1Chl <i>a</i>	H212L & H212F 1Chl <i>a</i> & >1Chl <i>a</i> , 1Chl <i>b</i>	H212V 0.5Chl <i>a</i> , 0.5Chl <i>b</i>	H245L 0.3Chl <i>a</i> , 0.7Chl <i>b</i>
<i>b6</i>	Q131A 1Chl <i>b</i>	Q131S & Q131E 1Chl <i>b</i> & 0Chl	Q131V & Q131E 1Chl <i>b</i> & 1Chl <i>a</i>	E166V 1Chl <i>a</i> , 1Chl <i>b</i>
<i>a2</i>	N183A 1Chl <i>a</i>	-	N183V >1Chl <i>a</i> , 1Chl <i>b</i>	H216F 1Chl <i>a</i>

Tabelle 12: Chlorophyllverluste bei LHC Mutanten aus verschiedenen Arbeiten.

Aus dem Vergleich in Tabelle 12 ist ersichtlich, dass alle Autoren übereinstimmend bei Mutationen der Bindungsstellen für Chl *a5*, *a1* und *a2* den Verlust von Chl *a* und bei den Bindungsstellen von Chl *b5* und *b6* den Verlust von Chl *b* finden. Außerdem kann man erkennen, dass die Einführung von größeren hydrophoben Resten meist einen stärkeren Effekt in der Veränderung der Chlorophyllbindung hat. Offenbar werden dadurch auch benachbarte Pigmentbindungsstellen gestört. Bei den Arbeiten von Remelli et al. und Bassi et al. wurden bei Salzbrücken beide ionischen Reste getauscht, um auch den positiv geladenen Partner der Chl bindenden Aminosäure zu entfernen. Der Effekt einer nicht abgeschirmten Ladung und der Einführung einer weiteren Mutation muss hier abgewogen werden. Die vorliegende Arbeit und die Arbeit von Yang et al. zeigen, dass sich auch bei Entfernung nur eines Restes stabile Komplexe bilden. Beim Chl *a4* wurde in der vorliegenden Arbeit der Verlust von Chl *b* gefunden, ebenfalls ein geringer Verlust von Chl *b* in der Arbeit von Remelli et al.; die Autoren deuten dies jedoch in schwer nachvollziehbarer Weise als Verlust eines Chl *b* und eines Chl *a*. Im Lhcb4 ist diese Bindungsstelle mit Chl *a* besetzt. Bei Yang et al. ist die Chl *a4* Bindungsstelle nur als Doppelmutante mit Chl *a5* betroffen: Die Mutante verhält sich wie die Einzelmutante am Chl *a5*. Die Chl *a4* Bindungsstelle bleibt offenbar besetzt, da das Glutamat nur gegen Glutamin ersetzt wurde, welches ebenfalls als Chlorophyll-Ligand dienen kann.

Die Bindungsstelle Glycin 78 für Chl *a6* wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Einführung eines großen hydrophoben Restes gestört; hierbei überlagern sich jedoch weitreichendere Effekte der verringerten Proteinstabilität. Bei Remelli et al. wurde das in der Helix nahe gelegene Prolin 82 mutiert, um die Bindung des Chl *a6* zu stören: es ergaben sich jedoch keine Veränderungen in der Pigmentbindung dieser Mutante. Remelli et al. finden bei Chl *a3* und Chl *b3* unspezifische Besetzung der Bindungsstellen mit Chl *a* und Chl *b*, ähnlich wie in der Arbeit am Lhcb4. In der vorliegenden Arbeit und bei Yang et al. werden Chl *a3* und Chl *b3* als Chl *a* zugeordnet. Die Tieftemperaturspektren für Chl *b3* zeigen, dass dort nur eine Chlorophyllspezies gebunden ist (Abschnitt 3.6.3). Für die Bindungsstelle Chl *b6* postuliert Remelli et al., dass der bindende Rest, je nachdem ob es sich um Glutamin oder Glutamat handelt, die Bindungsspezifität für Chl *a* oder Chl *b* bestimmt. Da sich Chl *a* und Chl *b* nicht in ihrem Zentralatom unterscheiden, bleibt die chemische Grundlage dieser Hypothese unklar, die entsprechende Mutante zeigt bei Yang et al. auch kein solches Verhalten. Dort und in der vorliegenden Arbeit wird diese Bindestelle als Chl *b* identifiziert. Bei der Chl *a2* Bindungsstelle wurde in allen Arbeiten festgestellt, dass Chl *a* dort gebunden ist, was auch die spektroskopischen Daten klar zeigen. Übereinstimmend wird dieses Chlorophyll beim LHC-II und beim Lhcb4 als die langwelligste spektrale Spezies identifiziert.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich, dass die Daten aus der vorliegenden Arbeit hervorragend mit den Ergebnissen von Yang et al. übereinstimmen. Einige Unterschiede ergeben sich zur Arbeit am Mais LHC-II von Remelli et al.: Dies könnte durch das Rückfaltungsprotokoll bedingt sein, da dort mit einem Chl *a/b* Verhältnis von 2.3 begonnen wird, welches am stärksten vom Chl *a/b* Verhältnis des LHC-II von 1.4 abweicht. Die aufwendige Reinigung der *in vitro* rückgefalteten Komplexe in mehreren Schritten mag auch zur Destabilisierung der Pigment-Protein Komplexe beitragen. Trotzdem werfen diese Ergebnisse die Frage auf, ob sich LHC-II aus verschiedenen Spezies in der Pigmentbindung unterscheidet. Vergleicht man LHC-II mit dem minoren Lichtsammelkomplex Lhcb4, so findet man eine Konservierung der meisten, jedoch nicht aller Pigmentbindungsstellen.

Für die Modellierung kinetischer spektroskopischer Daten wurden den einzelnen Chlorophyllmolekülen bestimmte Absorptionswellenlängen zugeordnet. Hierbei wurde der Wechsel der Chlorophyllidentität für das Chl *b5* und Chl *a6* (Gradinaru et al., 1998) oder der Chl *a1*, *a2*, *b1* und *b2* (Trinkunas et al., 1997) vorgeschlagen. Dies ist bis auf den eventuellen Wechsel der Zuordnung für Chl *a6* nicht in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit.

4.5 Spektroskopische Zuordnung der Chlorophylle

Die mutierten LHC-II Komplexe wurden durch Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie unter Cryobedingungen untersucht. Das Einfrieren der Proteinumgebung der Pigmente bedingt schärfere Absorptionsbanden mit geringerer Halbwertsbreite, so dass sich ein besser aufgelöstes Spektrum ergibt. Der Einfluss der Temperatur auf das LHC-II Spektrum ist experimentell untersucht und kann theoretisch beschrieben werden (Zucchelli et al., 1996; Konermann & Holzwarth, 1996). Unter der Annahme eines spektralen Modells, in dem jedes Chlorophyll zu einer spektralen Subbande beiträgt, sollte beim Fehlen eines Chlorophyllmoleküles auch die zugehörigen spektralen Bande im Spektrum fehlen (siehe Abschnitt 4.6). Dies konnte in der Tat in den Differenzspektren der Mutanten beobachtet werden, die mit Hilfe von Tieftemperaturspektroskopie untersucht wurden. Den zugehörigen Chlorophyllen, deren Lage aus der Struktur bekannt ist, kann nun eine spektrale Wellenlänge zugeordnet werden (Tabelle 13).

<i>Chlorophyll</i>	<i>Zuordnung</i>	<i>Absorption</i>	<i>Bemerkung</i>
a4	<i>b</i>	?	Vorläufig, da monomer
a5	<i>a</i>	672nm	
a6	<i>b</i>	?	Vorläufig, da instabil
b5	<i>b</i>	640nm oder 650nm	
a1	<i>a</i>	?	
a3	<i>a</i>	?	Kopplung an <i>b3</i>
b3	<i>a</i>	659nm	
b6	<i>b</i>	649nm	
a2	<i>a</i>	677nm	

Tabelle 13: Spektrale Zuordnung der Chlorophyllmoleküle im LHC-II.

Weiterhin ist aus den Differenzspektren (Kapitel 3.6.3) ersichtlich, dass bei jeder Chlorophyll-Mutante im Wesentlichen nur eine abgegrenzte Bande fehlt. Die weiteren Veränderungen sind klein, und wahrscheinlich durch kleinere mutationsbedingte biochemische und spektrale Änderungen im Gesamtgefüge der anderen Pigmente im Komplex bedingt. Es kann ausgeschlossen werden, dass ein wesentlicher Anteil dieser Bindungsstellen gemischt mit Chlorophyll *a* und *b* besetzt ist, da sich sonst zwei Differenzbanden jeweils im spektralen Chl *a* und Chl *b* Bereich ergeben müssten. Auch bei denjenigen Mutanten, die keine interpretierbaren Spektren lieferten, ergaben sich keine Hinweise auf das gleichzeitige Fehlen beider Chlorophyll Spezies. Diese Information ist sehr wertvoll, da sie zeigt, dass die Bindungsstellen spezifisch von Chl *a* oder Chl *b* besetzt sind. Aus der HPLC Analyse war dies auf Grund der statistischen Schwankung der Daten nicht

zweifelsfrei ersichtlich. Dies rechtfertigt weiterhin die Interpretation der HPLC Daten im Sinne des Verlusts von jeweils einem Chlorophyllmolekül pro LHC Monomer bei einer gegebenen Mutante. So wurden beispielsweise aus den Daten für Chl *b3* angenommen, dass ein Chl *a* Molekül fehlt, wobei die HPLC Werte -0.4 Chl *a* und $+0.5$ Chl *b* betrugen. Da im Spektrum dieser Mutante nur eine Differenzbande (659nm) gemessen wurde, scheint diese Interpretation gerechtfertigt zu sein.

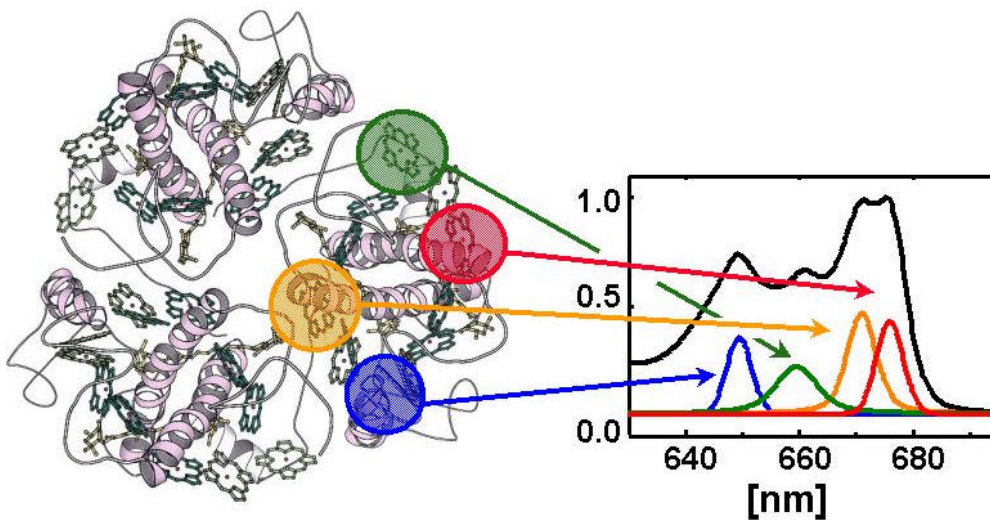


Abb. 56: Zuordnung von Chlorophyll *b6* (blau), *b3* (\rightarrow Chl *a*; grün), *a5* (gelb) und *a2* (rot) in Struktur und Spektrum.

Mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten kann jedem Absorptionsmaximum des Tieftemperaturspektrums ein bestimmtes Chlorophyllmolekül zugeordnet werden (Abb. 56): Zur Hauptbande der Chlorophyll *b* Absorption bei 649nm trägt das Chl *b6* bei. Das Maximum zwischen dem Chlorophyll *a* und *b* Bereich bei 659nm wird u.a. vom Molekül Chl *b3* verursacht. Hier ergab die HPLC Analyse, dass es sich um Chl *a* handelt. Die Chl *a* Absorption bei 672nm wird dem Chl *a5* zugeordnet. Auf Grund der Höhe dieser Bande sollte man aber davon ausgehen, dass mehr als ein Chlorophyll an diesem Maximum beteiligt ist. Eine interessante spektrale Bande ist diejenige bei 676nm, die dem Chl *a2* zugeordnet werden konnte. Diese betrifft einen niederenergetischen Übergang im Komplex, auf den die gesamte Anregungsenergie letztendlich übertragen wird. Genauer gesagt haben selektive Fluoreszenzexperimente gezeigt, dass ungefähr drei spektrale Banden pro Monomer zu demjenigen Cluster gehören, auf den die Anregungsenergie übertragen wird, und von dem die

Fluoreszenz des LHC-II ausgeht (Peterman et al., 1997). Entfernt man nun einen elektronischen Übergang daraus, wie dies bei der Mutante N183A (Chl *a*2) der Fall ist, so ergibt sich eine Verschiebung der Fluoreszenzemission zu kürzeren Wellenlängen, da einer der ursprünglich emittierenden Übergänge nicht mehr vorhanden ist.

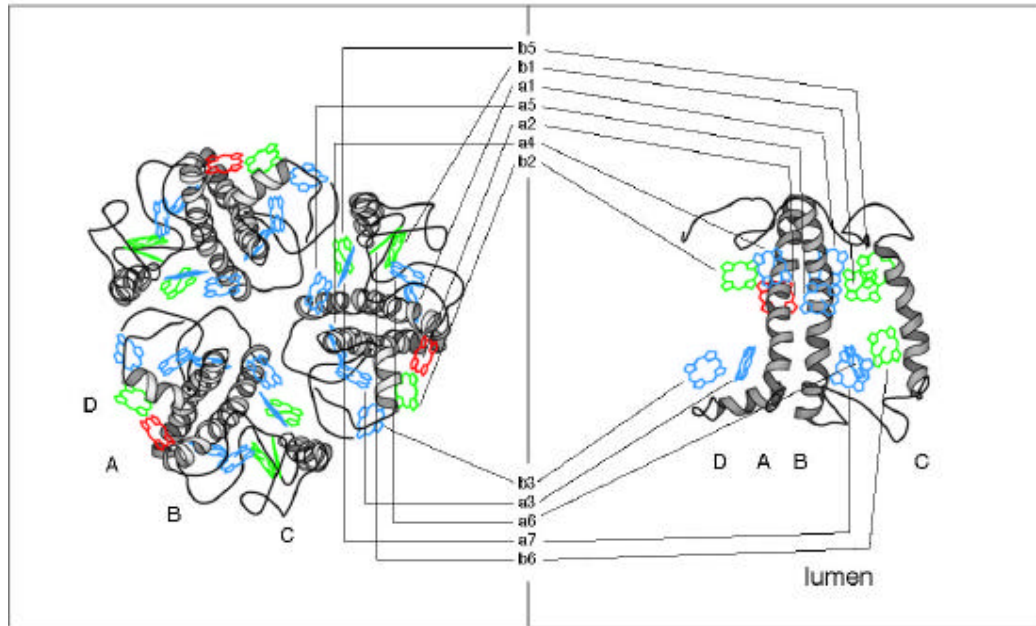


Abb. 57: LHC-II Trimer, Aufsicht (links) und LHC-II Monomer, Seitenansicht (rechts). Chl *a*: blau, Chl *b*: grün, Chl *a*2: rot. Chl Zuordnung nach Kühlbrandt et al., 1994, jedoch Chl *b*3 als Chl *a*.

In der Struktur ist ersichtlich, dass das Chl *a*2 dasjenige ist, welches am stärksten im trimeren Komplex nach außen exponiert ist (Abb. 57). Es befindet sich daher in einer idealen Position, die Anregungsenergie auf das photosynthetische Reaktionszentrum bzw. auf benachbarte LHC Komplexe zu übertragen. Auf Grund dieser Tatsache war bereits vor den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit postuliert worden, dass Chl *a*2 dasjenige ist, von dem aus die Anregungsenergie den LHC-II Komplex wieder verlässt (Kühlbrandt, 1994).

In den Arbeiten von Trinkunas et al. (1997) und Gradinaru et al. (1998) war die Energieübertragung im LHC-II modelliert worden. Dafür musste jedem Chlorophyllmolekül aus der Struktur eine bestimmte Wellenlänge zugeordnet werden, um dann dieses Modell an kinetische Absorptionsdaten anzupassen. Bei den dort vorgenommenen Zuordnungen können jedoch keine gemeinsamen Aspekte der beiden Arbeiten untereinander, und mit der vorliegenden Arbeit entdeckt werden. Die spektroskopische Zuordnung der LHC-II Mutanten aus Mais auf Grund von Raumtemperatur-Absorptionsspektren (Remelli et al., 1999) stimmt

prinzipiell mit der vorliegenden Arbeit überein. Dort wurde jedoch eine gemischte Besetzung einiger Bindungsstellen gefunden (vgl. Abschnitt 4.4.5).

4.6 Spektroskopisches Modell für den LHC-II

Die Funktion der Energieübertragung im LHC-II soll in einem adäquaten spektroskopischen Modell beschrieben werden. Hierzu gibt es prinzipiell verschiedene physikalische Prozesse, die den strahlungslosen Energietransfer zwischen den Pigmenten ermöglichen (Freer et al, 1996). Wenn die Chlorophyllmoleküle auf Grund eines gewissen Abstandes zueinander ($\sim 10\text{--}80\text{\AA}$) nicht stark miteinander interagieren, so bleibt die Anregungsenergie auf einzelne Chromophore lokalisiert. Die Energieübertragung erfolgt dann mittels Förster Transfer von einem Chlorophyll zum nächsten. Liegen die Chlorophylle nah beieinander ($<10\text{\AA}$), so kann es zu einer excitonischen Kopplung kommen: Die Anregungsenergie ist dann über mehrere Pigmente delokalisiert, die elektronischen Zustände, die angeregt werden können, beziehen sich nun auf das ganze Ensemble und unterscheiden sich von denen der Einzelpigmente. Schließlich ist auch eine Übertragung der Anregungsenergie durch direkten Austausch der Elektronen möglich, wenn sich die Orbitale der interagierenden Pigmente berühren (Abstand $<5\text{\AA}$), der sogenannte Dexter Transfer. Im ringförmigen, bakteriellen Lichtsammelkomplex LH2 sind diese Fälle bei verschiedenen Pigmentgruppen verwirklicht (Köhler, 2000). Die Bakteriochlorophyllmoleküle, die bei 800nm absorbieren, befinden sich im Abstand von ca. 20\AA . Sie können spektroskopisch als einzelne Chromophore gesehen werden, die die Energie in weniger als 1ps auf die ringförmig angeordneten B850 BChl Moleküle übertragen (Fleming & van Grondelle, 1997). Diese haben einen Abstand von ca. 9\AA der zentralen Mg^{2+} Atome zueinander und ihnen wird die Absorption bei 850nm zugeordnet. Dort ist die Anregungsenergie über mehrere Moleküle oder sogar über den gesamte Ring delokalisiert (Monshouwer & van Grondelle, 1996). Die excitonische Kopplung der Pigmente bedingt auch die starke Rotverschiebung ihrer Absorption. Da sich die π Elektronenwolken der einzelnen BChl Moleküle sehr nahe sind, spielt möglicherweise auch ein direkter Elektronentransfer eine Rolle.

Im pflanzlichen Lichtsammelkomplex sind die Pigmente nicht ringsymmetrisch angeordnet, und jedes einzelne befindet sich im LHC-II Monomer in einer anderen chemischen Umgebung. Im Falle der Mutanten Chl *b6*, *b3*, *a5* und *a2* konnte gezeigt werden, dass der Wegfall des jeweiligen Pigmentes sich auf einen limitierten Bereich des Spektrums auswirkt, der diesem einzelnen Chlorophyll zugeordnet werden kann. Dies spricht gegen eine starke excitonische Kopplung der Pigmente. Unter dieser Annahme kann das LHC-II Spektrum als

Addition der Einzelchromophorspektren gesehen werden. Dadurch kann ein spektrales Modell erstellt werden, in dem einzelne Subbanden dann das endgültige Spektrum bilden (Jennings et al., 1993). Eine eventuelle Kopplung einzelner Pigmentpaare könnte in dieses Modell integriert werden: In diesem Fall würde eine einzelne Subbande entsprechend von zwei gekoppelten Chlorophyllen gebildet. In einem solchen Modell kann dann die Weiterleitung der Anregungsenergie von Pigment zu Pigment (Exciton hopping) berechnet werden (Trinkunas et al., 1997; Gradinaru et al., 1998).

Die Spektren der trimeren Mutanten wurden als Angelpunkte verwendet, um eine Subbandenanalyse des LHC-II Spektrums zu erstellen. Die Banden wurden in diesem Modell so gewählt, dass sowohl die Spektren der Mutanten, als auch des rückgefalteten Wildtyps und des nativ isolierten Komplexes damit erklärt werden können. Als Bandenform wurden Voigt-Profile verwendet. Diese bestehen aus einer Faltung von Lorentzbande und Gaußbande, welche die homogene und inhomogene Verbreiterung der Banden repräsentieren (Demtröder, 1977; vgl. Abschnitt 1.8). Die Absorptionsbande eines einzelnen Chromophors lässt sich demnach folgendermaßen darstellen:

$$I_V(\omega) \sim \int_{-\infty}^{\infty} d\omega' \exp \left\{ -4 \ln 2 \left(\frac{\omega' - \omega_0}{g} \right)^2 \right\} \frac{1}{(\omega - \omega')^2 + (\Gamma/2)^2}$$

wobei I_V die Intensität der Voigtbande zentriert um deren Absorptionsmaximum ω_0 darstellt und Γ die homogene und γ die inhomogene Breite bezeichnet. ω ist die Wellenzahl, ω_0 das Absorptionsmaximum der Bande. ω' resultiert aus der Faltung zweier Funktionen.

Obwohl dies die Anzahl der Fitparameter erhöht, hat dies den Vorteil, dass die Parameter sinnvolle und physikalisch messbare Größen repräsentieren. Deren ungefähre Werte sind aus der Literatur bekannt, und können für die Anpassung der Subbanden eingesetzt werden: Aus Laser-spektroskopischen Messungen wurde ermittelt, dass die inhomogene Breite γ einer Einzelbande im LHC-II $70\text{-}120\text{cm}^{-1}$ beträgt, entsprechend 3-6nm. (Peterman et al., 1997; Pieper et al., 1999). Da dies die statistische Verteilung der Proteinumgebung eines einzelnen Chlorophyllmoleküls wiedergibt, sind die Werte bei allen Subbanden ungefähr gleich. Die homogenen Breiten Γ sind nicht bei allen Pigmenten gleich groß: Die meisten Chlorophyllmoleküle besitzen auf Grund der schnellen Energieübertragung eine sehr kurze Lebensdauer (Connelly et al., 1997), so dass deren Absorptionsbanden verbreitert sind mit einem Wert von Γ von 4-5nm. Nur die langwelligen Pigmente, auf die die Energie übertragen

wird, besitzen eine lange Lebensdauer, so dass deren spektrale Verbreiterung auf Grund dieses Mechanismus gering ist entsprechend einem kleinen Wert von Γ . Die Anregungsenergie wird auf die langwelligsten Banden bei 675nm und bei 678nm übertragen, deren homogene Breite Γ wurde mit 0.04nm und 0.01nm (entspricht 0.9cm^{-1} und 0.3cm^{-1}) bestimmt (Pieper et al., 1999). Die Fitparameter für das Wildtypspektrum sind in Tabelle 14 dargestellt.

l [nm]	619*	641.5	646.2	649.4	653.7	659.5	661.0	666.8	671.0	675.9	678.5
a	3.8*	0.6	1.0	0.5	1.2	0.6	1.0	1.0	1.7	1.2	0.5
G [nm]	0*	5.1	4.9	0.5	4.6	5.1	4.4	4.0	2.9	0 [†]	0 [†]
g [nm]	41.6*	7.3	5.4	4.9	5.5	5.9	5.2	5.0	4.5	5.6	7.0

Tabelle 14: Fitparameter der Subbandenanalyse. l, Wellenlänge der Subbande; a, Oszillatorstärke; G, homogene Breite; g, inhomogene Breite. *Summe über die Schwingungsbanden; [†] ungefähr 0. Farbcodierung wie in Abb. 56 und 58: 649.4nm – Chl *b6*, 659.5nm – Chl *b3*, 675.9nm – Chl *a2*.

Diejenigen Subbanden, die bei den Mutanten Q131A (Chl *b6*), H212A (Chl *b3*) und N183 A (Chl *a2*) fehlen, sind in Tabelle 14 farbig hervorgehoben. Die Bande bei 619nm resultiert aus der Summe der Chlorophyllschwingungsbanden, die die Absorption jenseits des Q_y Hauptmaximas verursachen (vgl. Abschnitt 1.8). Es verbleiben somit 10 Chlorophyllbanden, die für eine Berechnung des Gesamtspektrums mit physikalisch sinnvollen Werten für die Verbreiterungsparameter nötig waren. Wie in Abbildung 58 ersichtlich, haben zwei der Subbanden im Chlorophyll *a* Bereich ungefähr doppelte Höhe. Nimmt man an, dass deshalb jeweils zwei Chlorophylle mit ihnen korrespondieren, ergeben sich also insgesamt 12 Subbanden. Diese Zahl ist in hervorragender Übereinstimmung mit den 12 in die Struktur eingepassten Chlorophyllmolekülen. Biochemische Messungen des Chlorophyllgehalts ergaben einen etwas höheren Chlorophyllgehalt als 12 Moleküle pro LHC-II Monomer: Eine Erhöhung der Bandenzahl und damit der Fitparameter stellt aber in keinem Fall eine Schwierigkeit in diesem spektroskopischen Modell dar.

Der langwelligste Zustand wird von der Subbande bei 680 nm gebildet (Pieper et al., 1999), jedoch zeigte die Mutante an der Stelle des Chl *a2* (676nm) als einzige eine Verschiebung der Fluoreszenzemission. Der 680nm Zustand muss deshalb von einem Chlorophyll gebildet werden, das nicht durch die Mutationen aus der vorliegenden Arbeit betroffen war, also Chl *a7*, Chl *b1* oder Chl *b2*. Aus der Struktur ist ersichtlich, dass nur Chl *b1* und Chl *b2* eine exponierte Lage im Trimer innehaben (Abb. 57), welche für eine optimale Energieübertragung aus dem Komplex gefordert werden sollte – ob diese Bindungsstellen mit

Chl *b* oder Chl *a* besetzt sind, konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

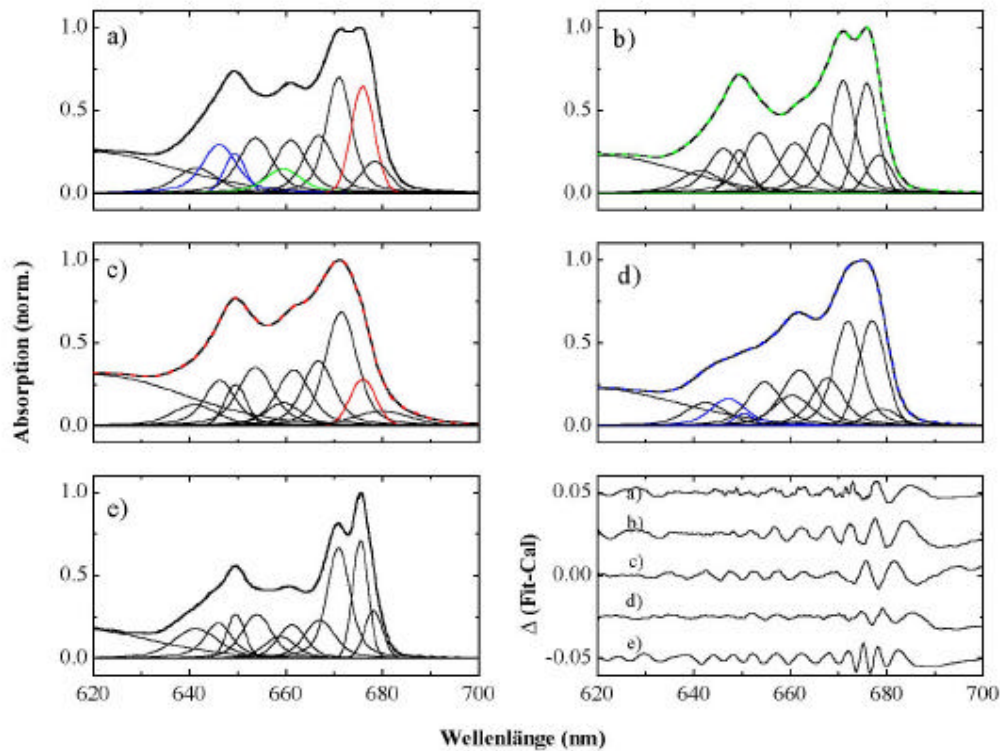


Abb. 58: Experimentelle LHC-II Spektren bei 4K und die dazugehörigen Fits mit Subbandenanalyse. a) rückgefalteter Wildtyp; Subbanden, die in den Mutante fehlen oder reduziert sind, wurden mit der entsprechenden Farbe gekennzeichnet b) Mutante H212A, Chl *b3*, c) Mutante N183A, Chl *a2*, d) Mutante Q131A, Chl *b6*, e) nativer LHC-II aus Erbse. Rechts unten sind die Differenzen zwischen Fit und experimenteller Messung gezeigt, die x-Achse wurde zur besseren Ansicht bei jeder Kurve etwas verschoben.

In Abbildung 58 sind die Tieftemperaturabsorptionsspektren des nativen LHC-II, des rückgefalteten Wildtyps, sowie der Mutanten mit der Subbandenanalyse dargestellt. Die Subbanden beim nativen LHC-II Komplex sind insgesamt etwas schmaler. Dies könnte man auf eine definiertere Pigmentbindung der *in vivo* gefalteten Komplexe zurückführen. Bei der Mutante H212 (Chl *b3* -> Chl *a*) ist ersichtlich, dass die Subbande bei 659 nm völlig fehlt. Bei der Mutante N183A (Chl *a2*) geht die Bande bei 676 nm auf ca. die Hälfte ihres Ursprungswertes zurück, und ist damit ungefähr so groß wie die restlichen Subbanden. Dies wird so interpretiert, dass im Wildtyp zwei Chlorophyllmoleküle zu dieser Bande beitragen und in der Mutante eines davon entfernt wurde. Bei der Mutante Q131A (Chl *b6*) fehlt die Subbande bei 649 nm, jedoch wurde auch die bei 646 nm um ca. die Hälfte reduziert. Tatsächlich zeigt die HPLC Analyse, dass möglicherweise etwas mehr als ein Chlorophyll *b*

verloren wurde. Wichtig für diese Betrachtung ist ein weiterer Faktor, nämlich die Reduktion des Neoxanthingehalts dieser Mutante auf $\frac{1}{2}$ bis $\frac{2}{3}$ des Wildtyp-LHC-II. Die Nichtbesetzung der Neoxanthinbindungstasche äußert sich ebenfalls in einer Reduktion der Chl *b* Absorptionsschulter (siehe Abschnitt 3.5.3).

Bei den Komplexen, die nur mit Chlorophyll *b* rückgefaltet wurden zeigte sich bei tiefen Temperaturen eine erstaunlich rotverschobene Fluoreszenz bei 678nm. Offenbar kann die Anregungsenergie nur bei tiefen Temperaturen auf dieses sehr langwellige Pigment quantitativ übertragen werden, da der Energietransfer durch die artifizielle Besetzung aller Bindungsstellen mit Chl *b* gestört ist. Die starke Rotverschiebung dieses Pigments, welches auch als Schulter im Absorptionsspektrum zu sehen ist, kann verschiedene Ursachen haben: Eine Verzerrung des Porphyringerüsts, wie sie für ein Chl *b* in einer Chl *a* Bindungstasche möglich wäre, könnte zu starker Rotverschiebung der Absorption führen, wie dies auch am bakteriellen LH2 beobachtet wurde (Freer et al., 1996). Weiterhin könnten einige Chlorophylle excitonisch gekoppelt sein, was ebenfalls zu einer starken Rotverschiebung führen kann. In jedem Falle stellt sich die Frage, ob das stark rotverschobene Chl *b* auch im nativen LHC-II vorhanden ist, oder ob es sich ausschließlich in dem nur mit Chl *b* rückgefalteten Komplex bildet. Wurde der LHC-II so rückgefaltet, dass sich nur ca. 1-2 Moleküle Chl *a* in einem Trimer befanden, so ergab sich bei tiefen Temperaturen ebenfalls die Fluoreszenz bei 679nm (Abschnitt 3.5.4) bzw. 678nm (Kleima et al., 1999). Diese Fluoreszenz war dem restlichen Chl *a* Anteil in diesen Komplexen zugeordnet worden. Hierfür musste eine Äquilibration der Anregungsenergie innerhalb eines Trimers gefordert werden. Da sich in der vorliegenden Arbeit gezeigt hat, dass diese Fluoreszenz auch vom Chl *b* stammen kann, muss nun keine Energieübertragung innerhalb eines Trimers gefordert werden. Vielmehr können die Monomere als kleinste lichtsammelnde Einheiten gesehen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Einzelpartikel-Fluoreszenzmessungen am LHC-II (Carsten Tietz, in Vorbereitung).

Ein weiterer Aspekt der Verbindung von Chl *b* mit langwelliger Fluoreszenz ist im Folgenden dargestellt: Das Fluoreszenzemissionsspektrum der Mutante N183A (Chl *a*2) war um 4nm blauverschoben, da hier ein Chlorophyll fehlte, das am terminalen Emitter beteiligt war. Es zeigte sich, dass die langwellige Schulter im Fluoreszenzspektrum bei 690nm, welche den langwelligsten Emissionsanteil im Spektrum dieser Mutante darstellt, nur dann beobachtet wurde, wenn Chl *b* angeregt wurde. Dies lässt sich so interpretieren, dass das langwelligste Pigment in dieser Mutante nur dann Energie abstrahlt, wenn es über ein Chl *b* angeregt wird,

mit dem es offenbar eng gekoppelt ist. Ob dieses langwellige Pigment ein Chl *a* oder Chl *b* ist, lässt sich jedoch aus diesem Experiment nicht entscheiden.

Eine plausible Erklärung der Fluoreszenzexperimente ergibt sich aus der Anordnung der Chlorophylle im LHC-II: Die Mehrzahl der Chlorophyll *a* Moleküle befinden sich in enger Nachbarschaft zu jeweils einem Chl *b* Molekül (Kühlbrandt et al., 1994), so dass eine Interaktion zwischen diesen wahrscheinlich ist (Pieper et al., 1999). Es ist deshalb gut vorstellbar, dass eine Anregung von Chl *b* eine effektive Übertragung auf das langwellige Chl *a* über ein solches Chl *a* – Chl *b* Paar ermöglicht. Bei Anregung von Chl *a* ist der Energiefluss zwischen den einzelnen Chl *a* Molekülen weniger effektiv. Dieses Phänomen ist nur bei der Mutante beobachtbar, da hier die Energieübertragung im Komplex durch die Entfernung eines Chlorophylls gestört ist. Werden im LHC-II artifiziell alle Chl Bindungsstellen mit Chl *b* besetzt (Abschnitt 3.5.4), so ergibt sich eine excitonische Kopplung eines oder mehrerer Chlorophyll *b* Paare, welche durch ihre abgesenkte Anregungsenergie zu der beobachteten langwelligen Fluoreszenz führen.

4.7 Ausblick

Um die Pigmentbindung im LHC-II zu untersuchen, wurde ein System entwickelt, mit dem *E. coli* exprimiertes Polypeptid aus Einschlusskörpern zusammen mit den Pigmenten rückgefaltet werden kann. Da dieses auf der Bindung von Histidin-markiertem Protein an eine Metall-Affinitätssäule basiert, hat es das Potential, auch bei der Faltung von anderen löslichen und Membranproteinen zum Einsatz zu kommen.

Drei-dimensionale Kristalle des nativen LHC-II lieferten bis jetzt noch nicht Daten von ausreichender Qualität, um eine röntgenkristallographische Struktur daraus zu erstellen, welche die elektronenkristallographische Struktur mit ihrer Auflösung von 3.4Å verbessert. Eine mögliche Ursache dafür besteht in der Heterogenität des nativen LHC-II, die aus den verschiedenen Isoformen des Polypeptids resultiert. Rückgefalteter LHC-II besteht im Gegensatz dazu nur aus einer Polypeptidspezies, so dass die Kristallisation des rekombinanten Komplexes möglicherweise dieses Problem lösen kann.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen die Hypothese, dass die beiden zentralen Carotinoidbindungsstellen im LHC-II durch Lutein besetzt sind, welches zur Lichtsammelfunktion beiträgt und evtl. toxische Triplettanregungszustände des Chlorophylls löscht. Eine darüber hinausgehende Funktion für das Carotinoid Neoxanthin ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt, und bedarf weiterer Untersuchungen. Jedoch konnte aus den Daten der vorliegenden Arbeit erstmals eine ungefähre Lokalisation des Neoxanthins in der

LHC-II Struktur bestimmt werden. Die Bestimmung der Bindungsstelle für Violaxanthin, ein wichtiges Carotinoid des Xantophyllcyclus, ist zum jetzigen Zeitpunkt größtenteils spekulativ.

Durch den Einbau von Chlorophyll-Derivaten in den LHC-II wurde nachgewiesen, dass das Zentralatom einen wesentlichen Faktor zur Stabilisierung der Bindung darstellt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Punktmutanten, bei denen der Aminosäurereste, der das zentrale Mg^{2+} des Chlorophylls bindet, entfernt wurde: das zugehörigen Chlorophyll wurde nicht mehr gebunden, so dass mutierte Komplexe mit verändertem Chlorophyllgehalt entstanden. Deren Pigmentgehalt gab darüber Aufschluss, ob der betreffenden Bindungsstelle Chlorophyll *a* oder Chlorophyll *b* zugeordnet werden muss. Dadurch konnten die Hälfte der aus der elektronenkristallographischen Struktur bekannten Chlorophylle untersucht werden, wobei sich bis auf das Chl *b3* die dort vorgenommene Chlorophyllzuordnung bestätigte. Bei drei weiteren Mutanten gab es Hinweise, dass die Identitäten von Chlorophyll *a6* und *a4* zu Chl *b* geändert werden sollten. Die Instabilität und der Verlust der Trimerisierungsfähigkeit dieser Komplexe führen jedoch dazu, dass weitere Experimente zur zweifelsfreien Zuordnung dieser Chlorophylle nötig sind. Schließlich sind für die Chlorophylle *b1*, *b2* und *a7* keine bindenden Aminosäuren bekannt, so dass deren Identitäten wahrscheinlich nur durch höher aufgelöste Strukturdaten endgültig geklärt werden können.

Da die wesentliche Funktion des LHC-II in der Absorption und Weiterleitung von Lichtenergie besteht, ist es wichtig, die spektroskopischen Eigenschaften seiner Chromophore zu kennen. Für jede der vier Chlorophyllabsorptionsbanden, die im Tieftemperaturspektrum des Komplexes sichtbar sind, konnte in der vorliegenden Arbeit aus den Differenzspektren der Mutanten ein bestimmtes Chlorophyllmolekül zugeordnet werden. Die spektroskopische Zuordnung der anderen Chlorophylle muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Diese ersten Ergebnisse haben jedoch gezeigt, dass solch eine Zuordnung überhaupt möglich ist, d.h. dass die Chlorophylle auch spektroskopisch als einzelne Chromophore betrachtet werden können, die keiner starken excitonischen Kopplung unterliegen. Sind die Absorptionswellenlängen aller Chlorophylle bekannt, kann ein kinetisches Modell erstellt werden, das den Energietransfer im LHC-II beschreibt. Zusammen mit der dreidimensionalen Struktur wird dies ein umfassendes Verständnis der pflanzlichen Lichtsammelkomplexe ermöglichen.

ANHANG

A. Strukturformeln photosynthetischer Pigmente

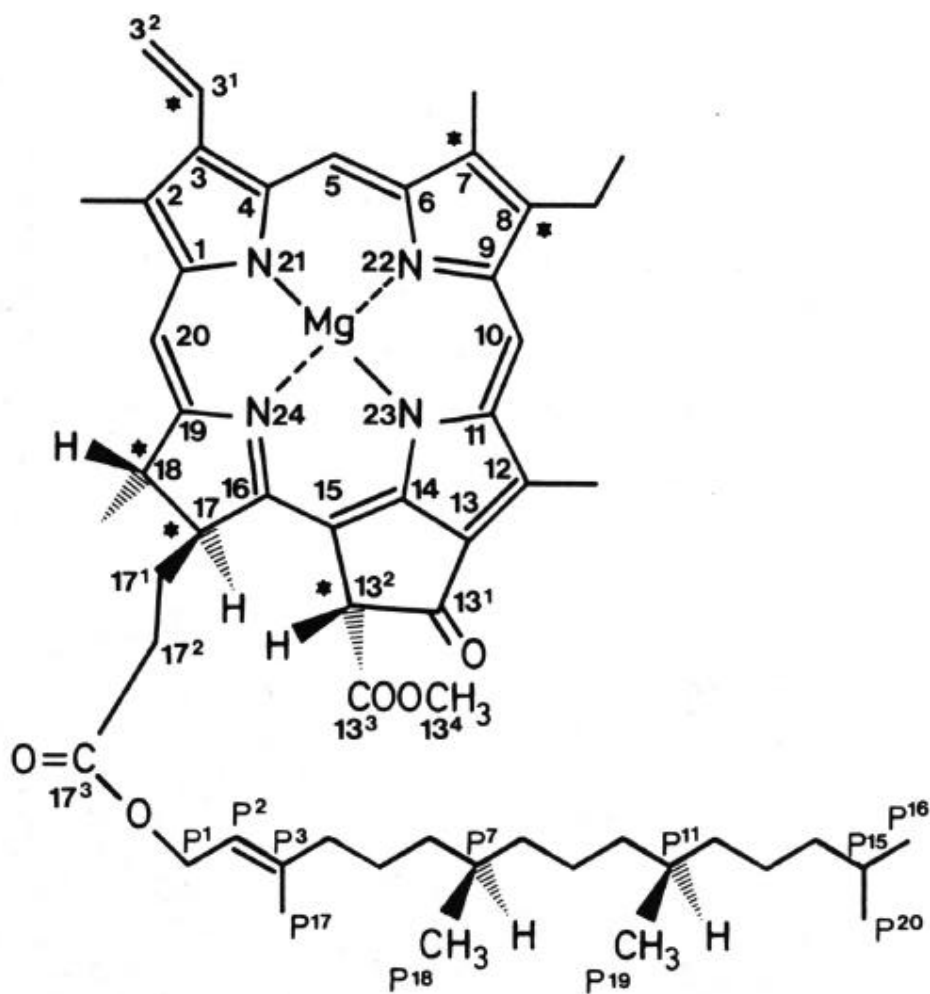


Abb. 59: Strukturformel des Chlorophyll *a* mit IUPAC Nomenklatur (P steht für die C Atome der Phytolkette).

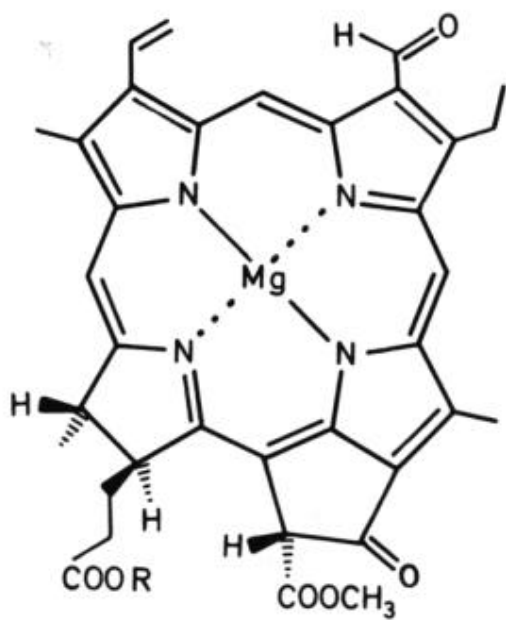


Abb. 60: Chlorophyll *b*

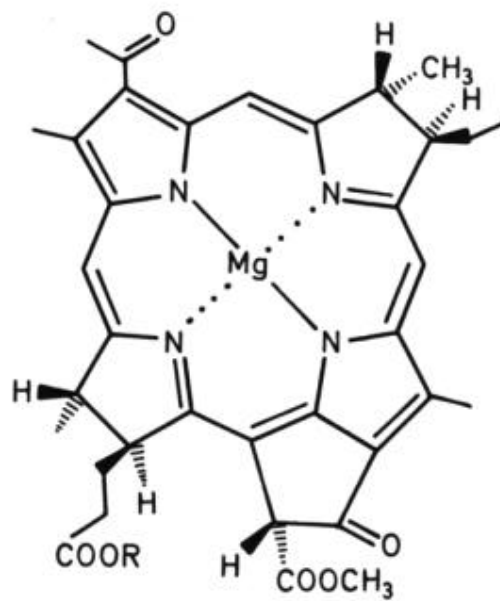


Abb. 61: Bacteriochlorophyll *a*

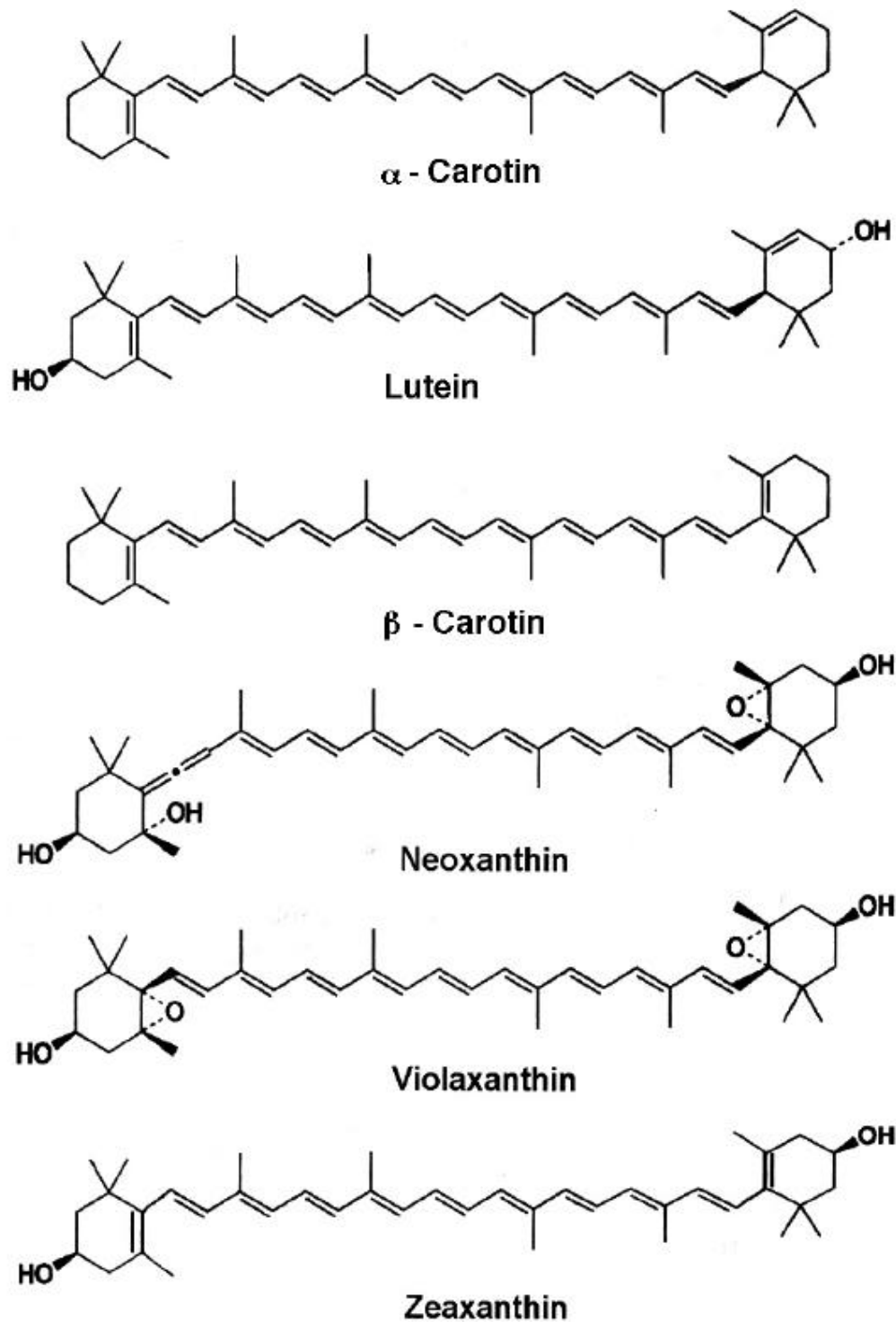


Abb. 62: Wichtige Carotinoide/Xantophylle der Thylakoidmembran: Lutein, ein α -Carotin; Neoxanthin, Violaxanthin und Zeaxanthin sind β -Carotinoide.

B. LHC-his Sequenz

Experimentell ermittelte Sequenz des Inserts des Klons C3.2h. In der Aminosäureübersetzung sind Anfang und Ende der LHC-II Sequenz durch Fettdruck markiert.

```
198/1          228/11
TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG AAT TCA TTA AAG AGG GAA TTA AGC ATG CGT AAA TCT
*  A  D  N  N  F  T  Q  N  S  L  K  R  E  L  S  M  R  K  S

258/21        288/31
GCT ACC ACC AAG AAA GTA GCG AGC TCT GGA AGC CCA TGG TAC GGA CCA GAC CGT GTT AAG
A  T  T  K  K  V  A  S  S  G  S  P  W  Y  G  P  D  R  V  K

318/41        348/51
TAC TTA GGC CCA TTC TCC GGT GAG TCT CCA TCC TAC TTG ACT GGA GAG TTC CCC GGT GAC
Y  L  G  P  F  S  G  E  S  P  S  Y  L  T  G  E  F  P  G  D

378/61        408/71
TAC GGT TGG GAC ACT GCC GGA CTC TCT GCT GAC CCA GAG ACA TTC TCC AAG AAC CGT GAG
Y  G  W  D  T  A  G  L  S  A  D  P  E  T  F  S  K  N  R  E

438/81        468/91
CTT GAA GTC ATC CAC TCC AGA TGG GCT ATG TTG GGT GCT TTG GGA TGT GTC TTC CCA GAG
L  E  V  I  H  S  R  W  A  M  L  G  A  L  G  C  V  F  P  E

498/101       528/111
CTT TTG TCT CGC AAC GGT GTT AAA TTC GGC GAA GCT GTG TGG TTC AAG GCA GGA TCT CAA
L  L  S  R  N  G  V  K  F  G  E  A  V  W  F  K  A  G  S  Q

558/121       588/131
ATC TTT AGT GAG GGT GGA CTT GAT TAC TTG GGC AAC CCA AGC TTG GTC CAT GCT CAA AGC
I  F  S  E  G  G  L  D  Y  L  G  N  P  S  L  V  H  A  Q  S

618/141       648/151
ATC CTT GCC ATA TGG GCC ACT CAG GTT ATC TTG ATG GGA GCT GTC GAA GGT TAC CGT ATT
I  L  A  I  W  A  T  Q  V  I  L  M  G  A  V  E  G  Y  R  I

678/161       708/171
GCC GGT GGG CCT CTC GGT GAG GTG GTT GAT CCA CTT TAC CCA GGT GGA AGC TTT GAT CCA
A  G  G  P  L  G  E  V  V  D  P  L  Y  P  G  G  S  F  D  P

738/181       768/191
TTG GGC TTA GCT GAT GAT CCA GAA GCA TTC GCA GAA TTG AAG GTG AAG GAA CTC AAG AAC
L  G  L  A  D  D  P  E  A  F  A  E  L  K  V  K  E  L  K  N

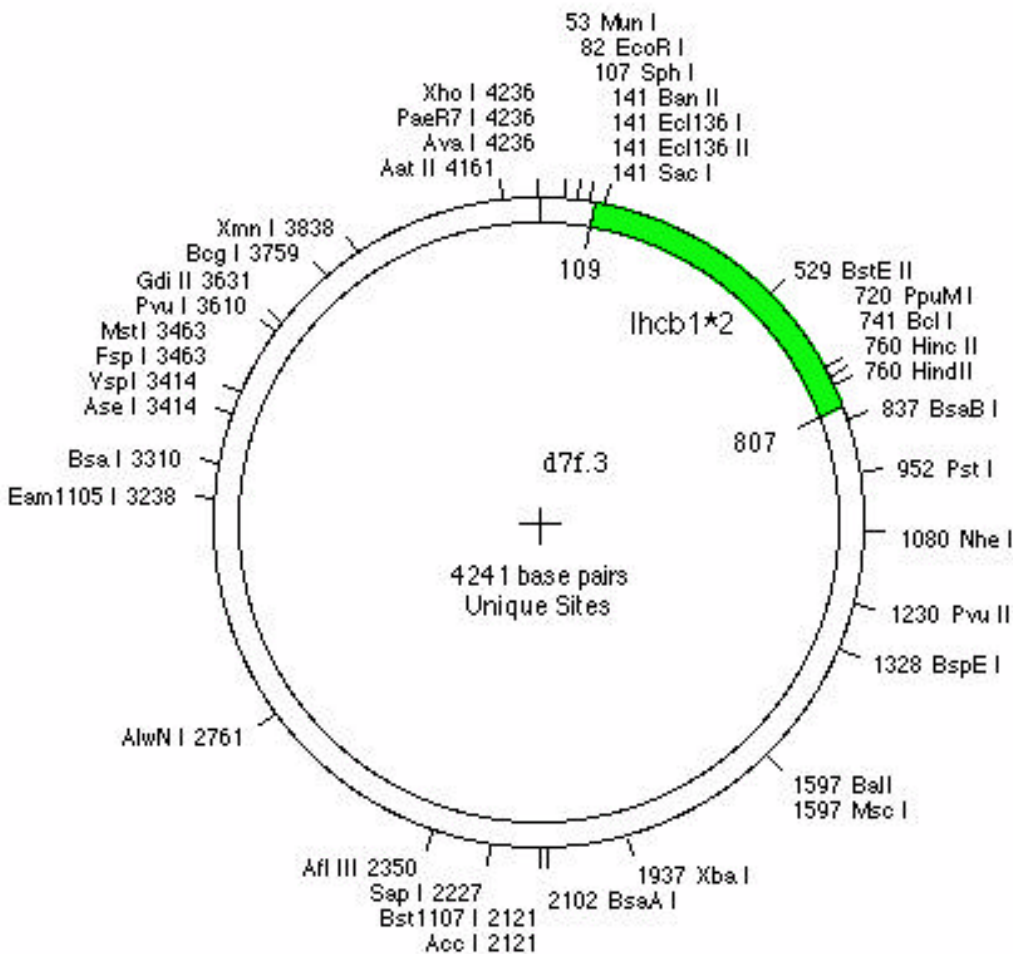
798/201       828/211
GGT AGA TTA GCC ATG TTC TCA ATG TTT GGA TTC TTC GTT CAA GCT ATT GTA ACT GGA AAG
G  R  L  A  M  F  S  M  F  G  F  F  V  Q  A  I  V  T  G  K

858/221       888/231
GGT CCT TTG GAG AAC CTT GCT GAT CAT CTT GCA GAC CCA GTC AAC AAC AAT GCA TGG TCA
G  P  L  E  N  L  A  D  H  L  A  D  P  V  N  N  N  A  W  S

918/241       948/251
TAT GCC ACC AAC TTT GTT CCC GGA AAA CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA CCC GGG AAA TAA
Y  A  T  N  F  V  P  G  K  H  H  H  H  H  H  *  P  G  K  *

978/261
ACA TCT TAA TTT AAG TTT TGA AAG G
T  S  *  F  K  F  *  K
```

C. Plasmidkarte und Sequenz des D7f3 Plasmids



AAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACAC
AGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATGCGTAAATCTGCTACCACCAAGAAAGTAGCGAGCTCTGGAAGCCCATGGT
ACGGACCAGACCGTGTTAAGTACTTAGGCCATTCTCCGGTGAGTCTCCATCTACTTGACTGGAGAGTTCCCCGGTGAC
TACGGTTGGGACACTGCCGACTCTCTGCTGACCCAGAGACATTCTCCAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAG
ATGGGCTATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTCGGCGAAGCTGTGT
GGTTC AAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGTTGACTTGATTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGC
ATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTTATCTTGATGGGAGCTGTGCAAGGTTACCGTATTGCCGGTGGGCCTCTCGGTGA
GGTGGTTGATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCATTTCGAGAATTGA
AGGTGAAGGAACCTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTCTCAATGTTTGGATTCTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGAAG
GGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCATCTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTC
CGGAAAATAAACACTCTTATATTTATATGTTTTTGTGATAGTAATCTTCTTCCCAATTCAATGTGAATTATTATCATTAT
CATTATCATGTGGGTATGCATAGGTTCACTAATACAAGATGATGGATGCTTTTTTTTACCAAATTTGGGCTGCAGCCA
AGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCTGTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTGTTCAGAACGC
TCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAAAT

GGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAG
TTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAG
TTTTATCCGGCCTTATTTCACATTCTTGCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGA
GCTTGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTG
AATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAAACCTGGCCTATTTTC
CCTAAAGGGTTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTGGC
CAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGTGG
CGATTACAGGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCCGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAG
TGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTAAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGGGTAATGACTCTCTGACTTGAGGC
ATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCCGTGAACGCTCTCCTGAGT
AGGACAAATCCGCGCTCTAGAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGA
GACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTC
GGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAC
TGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCC
TCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATC
CACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGT
TGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCG
ACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGG
ATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTATG
TCGTTGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTT
GAGTCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGT
TGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG
GAACGAAAACTCAGCTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAT
GAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC
TCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGCTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACC
ATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCG
GAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTA
AGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTGTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTAT
GGCTTCATTACAGTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT
TCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
ACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCG
ACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGCTCATATTGGAA
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAAC
TGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAAT
AAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCA
TGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCT
GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCACCTCGAG

D. CD-Banden des LHC-II, Literaturwerte

Wellenlänge	Vorzeichen	Probe, Temperatur, Ref.
651nm	Neg.	Nat. LHC-II, R.T., 1.)
667nm	Pos.	Nat. LHC-II, R.T., 1.)
678nm	Neg.	Nat. LHC-II, R.T., 1.)
640nm	Neg.	Nur Trimer, Nat. LHC-II, 77K, 2.)
648-651nm	Neg.	Nat. LHC-II, 77K, 2.)
659-667nm	Pos.	Nat. LHC-II, 77K, 2.)
674-677nm	Neg.	Nat. LHC-II, 77K, 2.)
475nm	Neg.	Nur Trimer, Rec. LHC-II, R.T., 3.)
ca. 490nm	Neg.	Rec. LHC-II, R.T., 3.)
Alle wie 2.)		Rec. LHC-II, 77k, 3.)
466nm	Pos.	Rec. Chl <i>b</i> LHC-II Monomere, R.T., 4.)
492nm	Neg.	Rec. Chl <i>b</i> LHC-II Monomere, R.T., 4.)
650nm	Neg.	Rec. Chl <i>b</i> LHC-II Monomere, R.T., 4.)

R.T.= Raumtemperatur, Nat.= nativ, Rec.=rekombinant.

Zu 2. & 3.) Monomere + Trimere.

1. Gülen, D. & Knox, R.S. (1984) Photobiochem. Photobiophys. 7, 277-286, *Absorption and circular dichroism of the chlorophyll-protein CP II: extensions of a trimeric exciton model.*
2. Nussberger, S., Dekker, J.P., Kühlbrandt, W., van Bolhuis, B.M., van Grondelle, R. & van Amerongen, H. (1994) Biochemistry 33, 14775-14783, *Spectroscopic Characterization of Three Different Monomeric Forms of the Main Chlorophyll *a/b* Binding Protein from Chloroplast Membranes.*
3. Peterman, E.J.G., Hobe, S., Calkoen, F., van Grondelle, R., Paulsen, H., van Amerongen, H. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1273, 171-174, *Low-temperature spectroscopy of monomeric and trimeric forms of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex.*
4. Hobe, S. (1995), Dissertation, *Trimerisierung des in-vitro-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopischen Untersuchungen zur Pigmentorganisation.*

LITERATURVERZEICHNIS

- Adamska, I., Roobol-Boza, M., Lindahl, M. & Andersson, B. (1999) *Eur. J. Biochem.* 260, 453-460, *Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea.*
- Agarwal, R., Krueger, B.P., Scholes, G.D., Yang, M., Yom, J., Mets, L. & Fleming, G.R. (2000) *J. Phys. Chem. B* 104, 2908-2918, *Ultrafast Energy Transfer in LHC-II Revealed by Three-Pulse Photon Echo Peak Shift Measurements.*
- Ainsworth, S. (1976) in *Introduction to the Spectroscopy of Biological Polymers*, Editor: Jones, D.W., Academic Press, 145-163, *Electronic Absorption and Emission Spectroscopy*
- Allen, J.F., Bennett, J., Steinback, K.E. & Arntzen, C.J. (1981) *Nature* 291, 25-29, *Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems.*
- Allen, J.F. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 12-17, *How does protein phosphorylation regulate photosynthesis ?*
- Altamirano, M.M., Golbik, R., Zahn, R., Buckle, A.M. and Fersht, A.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3576-3578, *Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones.*
- Arntzen, C.J. & Ditto, C.L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 259-274, *Effects of cations upon chloroplast membrane subunit interactions and excitation energy distribution.*
- Barber J. & Andersson, B. (1994) *Nature* 370, 31-34, *Revealing the blueprint of photosynthesis.*
- Bassi, R., Croce, R., Cugini, D. & Sandona, D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10056-10061, *Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites.*
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P. & Marquardt, J. (1993) *Eur. J. Biochem.* 212, 297-303, *Carotenoid-binding proteins of photosystem II.*
- Boardman, N.K. & Anderson, J.M. (1964) *Nature* 203, 166-167, *Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different portions of chlorophyll a and chlorophyll b and their possible role in the light reactions of photosynthesis.*
- Boardman, N.K. & Highkin, H.R. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 126, 189-199, *Studies on a barley mutant lacking chlorophyll b – I. Photochemical activity of isolated chloroplasts.*
- Booth, P.J. and Paulsen H. (1996) *Biochemistry* 35, 5103-5108, *Assembly of Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex in Vitro. Time-Resolved Fluorescence Measurements.*
- Braman J., Papworth C. & Greener A. (1996) in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 57 (Trower, M.K., Ed.) pp 31-44, Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA, *Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates.*
- Brejč, K., Ficner, R., Huber, R. & Steinbacher, S. (1995) *J. Mol. Biol.* 249, 424-440, *Isolation, Crystallisation, Crystal Structure Analysis and Refinement of Allophycocyanin from the Cyanobacterium Spirulina platensis at 2.3 Å Resolution.*
- Burke, J.J., Ditto, C.L. & Arntzen, C.J. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 252-263, *Involvement of the Light-Harvesting Complex in Cation Regulation of Excitation Energy Distribution in Chloroplasts.*
- Butler, P.J.G. & Kühlbrandt, W. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3797-3801, *Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes.*
- Cammarata, K.V. & Schmidt, G.W. (1992) *Biochemistry* 31, 2779-2789, *In Vitro Reconstitution of a Light-Harvesting Gene Product: Deletion Mutagenesis and Analyses of Pigment Binding.*
- Cashmore, A.R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2960-2964, *Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a light-harvesting chlorophyll a/b-binding polypeptide.*
- Cline, K. (1986) *J. Biol. Chem.* 31, 14804-14810, *Import of Proteins into Chloroplasts.*
- Cogdell, R.J., Fyfe, P.K., Barrett, S.J., Prince, S.M., Freer, A.A., Isaacs, N.W., McGlynn, P. & Hunter, N. (1996) *Photosynth. Res.* 48, 55-63, *The purple bacterial photosynthetic unit.*

- Connelly, J.P., Müller, M.G., Bassi, R., Croce R. & Holzwarth, A.R. (1997) *Biochemistry* 36, 281-286, *Femtosecond Transient Absorption Study of Carotenoid to Chlorophyll Energy Transfer in the Light-Harvesting Complex II of Photosystem II*.
- Connelly, J.P., Müller, M.G., Huckle, M., Gatten, G., Mullineaux, C.W., Ruban, A.V., Horton, P. & Holzwarth, A.R. (1997) *J. Phys. Chem. B* 101, 1902-1909, *Ultrafast Spectroscopy of Trimeric Light-Harvesting Complex II from Higher Plants*.
- Cowther, R.A. Henderson, R. & Smith, J.M. (1996) *J. Struct. Biol* 116, 9-16, *MRC Image Processing Programs*
- Croce R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J. & Bassi, R. (1999a) *FEBS lett.* 456, 1-6, *The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants*.
- Croce, R., Weiss, S. & Bassi, R. (1999b) *J. Biol. Chem.* 274, 29613-29623, *Carotenoid-binding Sites of the Major Light-harvesting Complex II of Higher Plants*.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1985) *Nature* 318, 618-624, *Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of Rhodospseudomonas viridis at 3 Å resolution*.
- Dekker, J.P., van Roon, H. & Bokema, E.J. (1999) *FEBS lett.* 449, 211-214, *Heptameric association of light-harvesting complex II trimers in partially solubilized photosystem II membranes*.
- Demtröder, W. (1977) Springer Verlag, ISBN 3-540-08331-6, *Grundlagen und Techniken der Laserspektroskopie*, 39-56.
- Dilly-Hartwig, H., Allen, J.F., Paulsen, H., Race, H.L. (1998) *FEBS Lett.* 435, 101-104, *Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes*
- Duerring, M. Schmidt, G.B. & Huber, R. (1991) *J. Mol. Biol.* 217, 577-592, *Isolation, Crystallisation, Crystal Structure Analysis and Refinement of Constitutive C-phycocyanin from the Chromatically Adapting Cyanobacterium Fremyella diplosiphon at 1.66 Å Resolution*.
- Eads, D.D., Castner, E.W., Alberte, R.S., Mets, L. & Fleming, G.R. (1989) *J. Phys. Chem.* 93, 8271-8275, *Direct Observation of Energy Transfer in a Photosynthetic Membrane: Chlorophyll b to Chlorophyll a Transfer in LHC*.
- Färber, A., Young, A.J., Ruban, A.V., Horton, P. & Jahns, P. (1997) *Plant Physiol.* 115, 1609-1618, *Dynamics of Xanthophyll-Cycle Activity in Different Antenna Subcomplexes in the Photosynthetic Membranes of Higher Plants- The Relationship between Zeaxanthin Conversion and Nonphotochemical Fluorescence Quenching*.
- Fenna, R.E. & Matthews, B.W. (1975) *Nature* 258, 573-577, *Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from Chlorobium limicola*.
- Fiedor, L., Scheer, H., Hunter, C.N., Tschirschwitz, F., Voigt, B., Ehlert, J., Nibbering, E., Leupold, D. & Elsaesser, T. (2000) *Chem. Phys. Lett.* 319, 145-152, *Introduction of a 60 fs deactivation channel in the photosynthetic antenna LH1 by Ni-bacteriopheophytin a*.
- Flachmann, R. & Kühlbrandt W. (1995) *Plant Cell* 7, 149-160, *Accumulation of Plant Antenna Complexes Is Regulated by Post-Transcriptional Mechanisms in Tobacco*.
- Flachmann, R. & Kühlbrandt W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14966-14971, *Crystallization and identification of an assembly defect of recombinant antenna complexes produced in transgenic tobacco plants*.
- Fleming, G.R. & van Grondelle, R. (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* 7, 738-748, *Femtosecond spectroscopy of photosynthetic light-harvesting systems*.
- Frank, H.A. & Cogdell, R.J. (1996) *Photochem. Photobiol.* 63, 257-264, *Carotenoids in Photosynthesis*.
- Frank, H.A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosytola, D. & Wasielewski, M.R. (1994) *Photosynth. Res.* 41, 389-395, *Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis*.
- Freer, A., Prince, S., Sauer, K., Papiz, M., Hawthornthwaite-Lawless, A., McDermott, G., Cogdell, R. & Isaacs, N.W. (1996) *Structure* 4, 449-462, *Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas acidophila*.
- Funk, C., Schröder, W.P., Green, B.R., Renger, G. & Andersson, B. (1994) *FEBS lett.* 342, 261-266, *The intrinsic 22kDa protein is a chlorophyll-binding subunit of the photosystem II*.
- Gal, A., Hauska, G., Herrmann, R. & Ohad, I. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19742-19749, *Interaction between Light Harvesting Chlorophyll a/b-Protein (LHCII) Kinase and Cytochrome b₆/f Complex*.

- Gall, B., Zehetner, A., Scherz, A., Scheer, H. (1998) FEBS lett. 434, 88-92, *Modification of pigment composition in the isolated reaction center of photosystem II.*
- Galla, H.J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Gannt, E. (1996) Photosynth. Res. 48, 47-53, *Pigment protein complexes and the concept of the photosynthetic unit: Chlorophyll complexes and phycobilisomes.*
- Garcia-pichel, F. (1998) Orig. Life & Evol. Biosphere 28, 321-347, *Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria.*
- Garnier, J., Wu, B., Maroc, J., Guyon, D. & Tremolieres, A. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1020, 153-162, *Restoration of both an oligomeric form of the light-harvesting complex antenna CP II and a fluorescence II-state I transition by D³-trans-hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol, in cells of a mutant of Chlamydomonas reinhardtii.*
- Gilmore, A.M. & Yamamoto, H.Y. (1991) J. Chromatography 543, 137-145, *Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C₁₈ high-performance liquid chromatographic column.*
- Giuffra, E., Cugini, D., Croce, R. & Bassi, R. (1996) Eur. J. Biochem. 238, 112-120, *Reconstitution and pigment-binding properties of recombinant CP29.*
- Giuffra, E., Zucchelli, G., Sandona, D., Croce, R., Cugini, D., Garlaschi, F.M., Bassi, R. & Jennings, R.C. (1997) Biochemistry 36, 12984-12993, *An analysis of Some Optical Properties of a Native and Reconstituted Photosystem II Antenna Complex: Pigment Binding Sites Can Be Occupied by Chlorophyll a or Chlorophyll b and Determine Spectral Forms.*
- Gradinaru C.C., Özdemir S., Gülen, D., van Stokkum, I.H.-M., van Grondelle, R. & van Amerongen, H. (1998) Biophys. J. 75, 3064-3077, *The Flow of Excitation Energy in LHCII Monomers: Implications for the Structural Model of the Major Plant Antenna.*
- Green, B.R. & Kühlbrandt, W. (1995) Photosynthesis Res. 44, 139-148, *Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII.*
- Green, B.R., Pichersky, E. & Kloppstech, K. (1991) Trends Biochem. Sci. 16, 181-186, *Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family.*
- Grisshammer, R. and Tate, C.G. (1995) Q. Rev. Biophys. 28, 315-422, *Overexpression of integral membrane proteins for structural studies.*
- Gruszecki, W.I., Grudzinski, W., Banaszek-Glos, A., Matula M., Kernen, P., Krupa, Z., Siewiewiesiuk, J. (1999) Biochim. Biophys. Acta 1412, 173-183, *Xanthophyll pigments in light-harvesting complex II in monomolecular layers: localisation, energy transfer and orientation.*
- Harrer, R., Bassi, R., Testi, M.G. & Schäfer, C. (1998) Eur. J. Biochem. 255, 196-205, *Nearest-neighbor analysis of a Photosystem II complex from Marchantia polymorpha L. (liverwort), which contains reaction center and antenna proteins.*
- Härtel, H., Lokstein, H., Grimm, B. & Rank, B. (1996) Plant Physiol. 110, 471-482, *Kinetic Studies on the Xanthophyll Cycle in Barley Leaves.*
- Härtel, H., Lokstein, H., Dörmann, P. & Benning, C. (1998)) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab, G. Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, pp. 1787-1792, *The use of lipid headgroup mutants to explore the function of thylakoid lipids in photosynthesis.*
- Heins, L., Collinson, I. & Soll, J. (1998) Trends Plant Sci., 3, 56-61, *The protein translocation apparatus of chloroplast envelopes.*
- Heinze, I., Pfündel, E., Hühn, M. & Dau, H. (1997) Biochim. Biophys. Acta 1320, 188-194, *Assembly of light harvesting complexes II (LHC-II) in the absence of lutein – A study on the a-carotenoid-free mutant C-2A'-34 of the green alga Scenedesmus obliquus.*
- Hemelrijk, P.W., Kwa, S.L.S., van Grondelle, R. & Dekker, J.P. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1098, 159-166, *Spectroscopic properties of LHC-II, the main light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from chloroplast membranes.*
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K.H. (1990) J. Mol. Biol. 213, 899-929, *Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy.*

- Henrysson, T., Schroeder, W.P., Spangfort, M. & Akerlund, H.E. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 301-308, *Isolation and characterization of the chlorophyll a and b complex CP29 from spinach.*
- Hobe, S. (1995a) Dissertation, Verlag Mainz Wissenschaftsverlag Aachen, ISBN 3-89653-004-6, *Trimerisierung des in-vitro-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopischen Untersuchungen zur Pigmentorgansiation*
- Hobe, S., Foerster, R., Klingler, J. & Paulsen, H. (1995b) *Biochemistry* 34, 10224-10228, *N-Proximal Sequence Motif in Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Binding Protein Is Essential for the Trimerization of Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex.*
- Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W. & Paulsen, H. (1994) *EMBO J.* 13, 3423-3429, *Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex*
- Hofmann, E., Wrench, P.M., Sharples, F.P., Hiller, R.G., Welte, W., Diederichs, K. (1996) *Science* 272, 1788-1791, *Structural Basis of Light Harvesting by Carotenoids: Peridinin-Chlorophyll-Protein from Amphidinium carterae.*
- Hooper, J.K. & Eggink, L.L. (1999) *Photosynth. Res.* 61, 197-215, *Assembly of light-harvesting complex II and biogenesis of thylakoid membranes in chloroplasts.*
- Jansson S., Pichersky, E., Bassi, R., Green, B.R., Ikeuchi, M., Melis, A., Simpson, D.J., Spangfort, M., Staehelin, L.A. & Thornber, J.P. (1992) *Plant Mol. Biol. Rep.* 10, 242-253, *A Nomenclature for the Genes Encoding the Chlorophyll a/b-Binding Proteins of Higher Plants.*
- Jansson, S. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 1-19, *The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins.*
- Jansson, S., Stefansson, H., Nyström, U. Gustafsson, P., Albertsson, P.A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 297-309, *Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains.*
- Jennings, R.C., Bassi, R., Garlaschi, F.M., Dainese, P. & Zucchelli, G. (1993) *Biochemistry* 32, 3203-3210, *Distribution of the Chlorophyll Spectral Forms in the Chlorophyll-Protein Complexes of Photosystem II Antenna.*
- Jungas, C., Ranck, J.L., Rigaud, J.L., Joliot, P. & Vermeglio, A. (1999) *EMBO J.* 18, 534-542, *Supramolecular organisation of the photosynthetic apparatus of Rhodospirillum rubrum.*
- Karrasch, S., Bullough, P.A. & Gosh, R. (1995) *EMBO J.* 14, 631-638, *The 8.5 Å projection map of the light-harvesting complex I from Rhodospirillum rubrum reveals a ring composed of 16 subunits.*
- Katz, J.J., Bowman, M.K., Michalski, T.J. & Worcester, D.L. (1991) in *Chlorophylls*, Editor: Scheer, H., CRC Press, 211-235, *Chlorophyll aggregation: chlorophyll/water micelles as models for in vivo long-wavelength chlorophyll*
- Kim, S.J., Jansson, S., Hoffman, N.E., Robinson, C. & Mant, A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 4715-4721, *Distinct "Assisted" and "Spontaneous" Mechanisms for the Insertion of Polytopic Chlorophyll-binding Proteins into the Thylakoid Membrane.*
- Kleima, F.J., Gradinaru, C.C., Calkoen, F., van Stokkum, I.H.M., van Grondelle, R. & van Amerongen, H. (1997) *Biochemistry* 36, 15262-15268, *Energy Transfer in LHCII monomers at 77K Studied by Sub-Picosecond Transient Absorption Spectroscopy.*
- Kleima, F.J., Hobe, S., Calkoen, F., Urbanus, M.L., Petermann, E.J.G., van Grondelle, R., Paulsen, H. & van Amerongen, H. (1999) *Biochemistry* 38, 6587-6596, *Decreasing the Chlorophyll a/b Ratio in Reconstituted LHCII: Structural and Functional Consequences.*
- Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K. & Michel, H. (1996) *Structure* 4, 581-597, *The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from Rhodospirillum rubrum.*
- Köhler, J. (2000) *Physikalische Blätter* 56, 47-50, *Photosynthese und Excitonen – Quantenzustände in Antennenkomplexen beschleunigen die Photosynthese.*
- Kohorn, B.D. & Tobin, E.M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12897-12899, *Amino Acid Charge Distribution Influences the Assembly of Apoprotein into Light-harvesting Complex II.*
- Kosemund, K. (2000) Dissertation an der Universität Mainz, Institut für Allgemeine Botanik (H. Paulsen), *Die Biogenese von Chlorophyll-a/b-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion*

- Konermann, L. & Holzwarth, A.R. (1996) *Biochemistry* 35, 829-842, *Analysis of the Absorption Spectrum of Photosystem II Reaction Centers: Temperature Dependence, Pigment Assignment, and Inhomogeneous Broadening*.
- Krauß, N., Schubert, W.D., Klukas, O., Fromme, P., Witt, H.T. & Saenger, W. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 965-973, *Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system*.
- Kühlbrandt, W. (1984) *Nature* 307, 478-480, *Three-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex*.
- Kühlbrandt, W. (1987) *J. Mol. Biol.* 194, 757-762, *Three-dimensional Crystals of the Light-harvesting Chlorophyll a/b Protein Complex from Pea Chloroplasts*.
- Kühlbrandt, W. (1988) *J. Mol. Biol.* 202, 849-864, *Structure of Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein Complex from Plant Photosynthetic Membranes at 7 Å Resolution in Projection*.
- Kühlbrandt, W. (1994) *Curr. Op. Struct. Biol.* 4, 519-528, *Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II*.
- Kühlbrandt, W. (1995) *Structure* 3, 521-525, *Structure and function of bacterial light-harvesting complexes*.
- Kühlbrandt, W., Thaler, T. & Wehrli, E. (1983) *J. Cell Biol.* 96, 1414-1424, *The Structure of Membrane Crystals of the Light-harvesting Chlorophyll a/b Protein Complex*.
- Kühlbrandt, W., Wang, D. & Fujiyoshi, Y. (1994) *Nature* 367, 614-621, *Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography*.
- Kuttkat, A., Edhofer, I., Eichacker, L.A. & Paulsen, H. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 20451-20455, *Light-harvesting Chlorophyll a/b-binding Protein Stably Inserts into Etioplast Membranes Supplemented with Zn-pheophytin a/b*.
- Kuttkat, A., Grimm, R. & Paulsen, H. (1995) *Plant Physiol.* 109, 1267-1276, *Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Binding Protein Inserted into Isolated Thylakoids Bind Pigments and Is Assembled into Trimeric Light-Harvesting Complex*.
- Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S. & Paulsen, H. (1996) *Eur. J. Biochem.* 242, 288-292, *The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex*.
- Kyte, J. & Doolittle, R.E. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132, *A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein*.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*.
- Lapouge, K., Naveke, A., Robert, B., Scheer, H. & Sturgis, J.N. (2000) *Biochemistry* 39, 1091-1099, *Exchanging cofactors in the core antennae from purple bacteria: Structure and properties of Zn-bacteriopheophytin-containing LH1*.
- Lee, A.I. & Thornber, J.P. (1995) *Plant Physiol.* 107, 565-574, *Analysis of the Pigment Stoichiometry of Pigment-Protein Complexes from Barley (Hordeum vulgare) – The Xanthophyll Cycle Intermediates Occur Mainly in the Light-Harvesting Complexes of Photosystem I and Photosystem II*.
- Leupold, D., Lokstein, H. & Hoffman, P. (1999) *Trends Photochem. & Photobiol.* 6, 43-52, *Structure-function relationships in the higher plant photosynthetic antenna complex LHC II as revealed by non-linear laser spectroscopy – the problem of “chlorophyll forms”*.
- Li, J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 386-390, *Light-harvesting chlorophyll a/b-protein: Three-dimensional structure of a reconstituted membrane lattice in negative stain*.
- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K. & Hoffman, N.E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3789-3793, *A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes*.
- Li, X.P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S. & Niyogi, K.K. (2000) *Nature* 403, 391-395, *A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting*.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) *Meth. Enzymol.* 148, 350-382, *Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes*.

- Ljungberg, O, Akerlund, H.E. & Andersson, B. (1986) *Eur. J. Biochem.* 158, 477-482, *Isolation and characterization of the 10-kDa and 22-kDa polypeptides of higher plant photosystem 2.*
- Lyon, M.K. & Miller, K.R. (1985) *J. Cell Biol.* 100, 1139-1147, *Crystallization of the Light-harvesting Chlorophyll a/b Complex within Thylakoid Membranes.*
- Marquardt, J. & Bassi, R. (1993) *Planta* 191, 265-273, *Chlorophyll-proteins from maize seedlings grown under intermittent light conditions – Their stoichiometry and pigment content.*
- May, V., Scheller, R. & Renger, T. (2000) *J. Lumin.* 87-89, 803-805, *Comparative theoretical studies on exciton dynamics in biological and artificial chromophore complexes.*
- McDermott, G., Prince, S.M., Freer, A.A., Hawthornthwaite-Lawless, A.M., Papiz, M.Z., Cogdell, R.J. & Isaacs, N.W. (1995) *Nature* 374, 517-521, *Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria.*
- Melis, A. (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Editor: Ort, D.R. & Yocum, C.F.) 523-538, *Excitation Energy Transfer: Functional and Dynamic Aspects of Lhc (cab) Proteins.*
- Meyer, M. & Scheer, H. (1995) *Photosynth. Res.* 44, 55-65, *Reaction centers of Rhodobacter sphaeroides R26 containing C-3 acetyl and vinyl(bacterio)pheophytins at sites H-A, B.*
- Meyer, M., Wilhelm, C. & Garab, G. (1996) *Photosynth. Res.* 49, 71-81, *Pigment-pigment interactions and secondary structure of reconstituted algal chlorophyll a/b-binding light-harvesting complexes from Chlorella fusca with different pigment compositions and pigment-protein stoichiometries.*
- Michel, H., Griffin, P.R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. & Bennett, J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 17584-17591, *Tandem mass spectrometry indentifies sites of three post-translational modifications of spinach light-harvesting chlorophyll protein II protolytic cleavage acetylation and phosphorylation.*
- Miller, K.R. & Lyon, M.K. (1985) *Trends Biochem. Sci.* 219-222, *Do we really know why chloroplast membranes stack?*
- Miroux, B. & Walker, J.E. (1996) *J. Mol. Biol.* 260, 289-298, *Over-production of Proteins in Escherichia coli: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels.*
- Mitchell P. (1976) *J. Theor. Biol.* 62, 327-367, *Possible Molecular Mechanisms of the Protonmotive Function of Cytochrome Systems.*
- Monshouwer, R., van Grondelle, R. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 70-75, *Excitations and excitons in bacterial light-harvesting complexes.*
- Moore, M., Harrison, S.H., Peterson, E.C. & Henry, R. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 1529-1532, *Chloroplast Oxa1p Homolog Albino3 Is Required for Post-translational Integration of the Light Harvesting Chlorophyll-binding Protein into Thylakoid Membranes.*
- Nitschke, W. & Rutherford, W.A. (1991) *TIBS* 16, 241-245, *Photosynthetic reaction centres: variations on a common structural theme ?*
- Niyogi, K.K., Björkman, O. & Grossman, A.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14162-14167, *The roles of specific xanthophylls in photoprotection.*
- Noji, H., Ysuda, R., Yoshida, M. & Kinosita Jr, K. (1997) *Nature* 386, 299-302, *Direct observation of the rotation of F₁-ATPase.*
- Nunn, J.F. (1998) *Proc. Geologists Ass.* 109, 1-13, *Evolution of the Atmosphere.*
- Nussberger S., Doerr K., Wang, D. and Kühlbrandt W. (1993) *J. Mol. Biol.* 234, 347-356, *Lipid-protein Interactions in Crystals of Plant Light-Harvesting Complex.*
- Nußberger, S. (1994) Dissertation am Lehrstuhl für Biophysik der TU München, durchgeführt am EMBL Heidelberg, *Untersuchungen zur oligomeren Struktur des Lichtsammlerkomplexes der Pflanze*
- Nussberger, S., Dekker, J.P., Kühlbrandt, W., van Bolhuis, B.M., van Grondelle, R. & van Amerongen, H. (1994) *Biochemistry* 33, 14775-14783, *Spectroscopic Characterization of Three Different Monomeric Forms of the Main Chlorophyll a/b Binding Protein from Chloroplast Membranes.*
- Ogawa, T., Obata, F., Shibata, K. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112, 223-234, *Two pigment proteins in spinach chloroplasts.*
- Omata, T. & Murata, N. (1980) *Photochem. Photobiol.* 31, 183-185, *A rapid and efficient method to prepare chlorophyll a and b from leaves.*

- Pagano, A., Cinque, G. & Bassi R. (1998) J. Biol. Chem. 273, 17154-17165, *In Vitro Reconstitution of the Recombinant Photosystem II Light-harvesting Complex CP24 and Its Spectroscopic Characterization*.
- Paulsen, H. & Hobe, S. (1992) Europ. J. Biochem. 205, 71-76, *Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein*.
- Paulsen, H. & Kuttkat, A. (1993) Photochem. Photobiol. 57, 139-142, *Pigment complexes of light-harvesting chlorophyll a/b binding protein are stabilized by a segment in the carboxyterminal hydrophilic domain of the protein*.
- Paulsen, H. (1995) Photochem. Photobiol. 62, 367-382, *Chlorophyll a/b-binding proteins*.
- Paulsen, H. (1997) Physiologia Plantarum 100, 760-768, *Pigment ligation to proteins of the photosynthetic apparatus in higher plants*.
- Paulsen, H., Finkenzeller, B. & Kühlein, N. (1993) Eur. J. Biochem 215, 809-816, *Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein*.
- Paulsen, H., Hobe, S. & Eisen, C. (1992) in NATO ASI Series A, Life Sciences Vol. 226: *Regulation of chloroplast biogenesis*, Editor: Argyroudi-Akoyunoglou, J.H., Plenum Press, New York, 343-348, *Reconstitution of LHCP-pigment complexes with mutant LHCP and chlorophyll analogs*.
- Paulsen, H., Rümmler, U. & Rüdiger, W. (1990) Planta 181, 204-211, *Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in Escherichia coli*.
- Peter, G.F. & Thornber, J.P. (1991) J. Biol. Chem. 266, 16745-16754, *Biochemical Composition and Organization of Higher Plant Photosystem II Light-harvesting Pigment-Proteins*.
- Peterman, E.J.G., Hobe, S., Calkoen, F., van Grondelle, R., Paulsen, H., van Amerongen, H. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1273, 171-174, *Low-temperature spectroscopy of monomeric and trimeric forms of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex*.
- Peterman, E.J.G., Monshouwer, R., van Stokkum, I.H.M., van Grondelle, R. & van Amerongen, H. (1997) Chem. Phys. Lett. 264, 279-284, *Ultrafast singlet excitation transfer from carotenoids to chlorophylls via different pathways in light-harvesting complex II of higher plants*.
- Peterman, E.J.G., Pullerits, T., van Grondelle, R. & van Amerongen, H. (1997) J. Phys. Chem. B, 101, 4448-4457, *Electron-Phonon Coupling and Vibronic Fine Structure of Light-Harvesting Complex II of Green Plants: Temperature Dependent Absorption and High-Resolution Fluorescence Spectroscopy*.
- Pieper, J., Rätsep, M., Jankowiak, R., Irrgang, K.D., Voigt, J., Renger, G. & Small, G.J. (1999) J. Phys. Chem. A 103, 2412-2421, *Qy-Level Structure and Dynamics of Solubilized Light-Harvesting Complex II of Green Plants: Pressure and Hole Burning Studies*.
- Plumley, F.G. & Schmidt, G.W. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 146-150, *Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer*.
- Pogson, B., McDonald, K.A., Truong, M., Britton, G. & DellaPenna D. (1997) Plant Cell 8, 1627-1639, *Arabidopsis Carotenoid Mutants Demonstrate That Lutein Is Not Essential for Photosynthesis in Higher Plants*.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. & Kriedmann, P.E. (1989) Biochim. Biophys. Acta 975, 384-394, *Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy*.
- Reddy, N.R.S., Lyle, P.A. & Small, G.J. (1992) Photosynth. Res. 31, 167-194, *Applications of spectral hole burning spectroscopies to antenna and reaction center complexes*.
- Remelli, R., Varotto, C., Sandona, D., Croce, R. & Bassi, R. (1999) J. Biol. Chem. 274, 33510-33521, *Chlorophyll Binding to Monomeric Light-Harvesting Complex*.
- Remy R., Tremolieres, A., Duval, J.C., Ambard-Bretteville, F. and Dubacq, J.P. (1982) FEBS Lett. 137, 271-275, *Study of the supramolecular organization of light-harvesting chlorophyll protein (LHCP) – Conversion of the oligomeric form into the monomeric one by Phospholipase A₂ and reconstitution with liposomes*.
- Rhee K.H., Morris, E.P., Barber, J. & Kühbrandt W. (1998) Nature 396, 283-286, *Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction center at 8 Å resolution*.

- Rogl H., Lamborghini, M. & Kühlbrandt, W. (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (1) (Garab, G. Ed.) pp.361-364, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, *Chlorophyll exchange on reconstituted LHCII: Chlorophyll a is essential for trimerisation.*
- Rogl, H. & Kühlbrandt, W. (1999) *Biochemistry* 38, 16214-16222, *Mutant Trimers of Light-Harvesting Complex II Exhibit Altered Pigment Composition and Spectroscopic Features.*
- Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W. & Collinson, I. (1998) *FEBS Lett.* 432, 21-26, *Refolding of E. coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography.*
- Ros, F., Bassi, R. & Paulsen, H. (1998) *Eur. J. Biochem.* 253, 653-658, *Pigment-binding properties of the recombinant photosystem II subunit CP26 reconstituted in vitro.*
- Rose, G.D. & Roy, S. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4643-4647, *Hydrophobic basis of packing in globular proteins.*
- Ruban, A.V. & Horton, P. (1999) *Plant Physiol.* 119, 531-542, *The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach.*
- Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J. & Horton, P. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 10458-10465, *Determination of the Stoichiometry and Strength of Binding of Xanthophylls to the Photosystem II Light Harvesting Complexes.*
- Ruban, A.V., Phillip, D., Young, A.J. & Horton, P. (1998) *Photochem. Photobiol.* 68, 829-834, *Excited-State Energy Level Does Not Determine the Differential Effect of Violaxanthin and Zeaxanthin on Chlorophyll Fluorescence Quenching in the Isolated Light-Harvesting Complex of Photosystem II.*
- Rudolph, R. and Hauske, L. (1996) *FASEB J.* 10, 49-56, *In vitro folding of inclusion body proteins.*
- Sandona, D., Croce, R., Pagano, A., Crimi, M., Bassi, R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 207-214, *Higher plants light harvesting proteins. Structure and function as revealed by mutation analysis of either protein or chromophore moieties.*
- Scheer, H. (1991) *Chlorophylls*, CRC Press.
- Schmid, V.H., Cammarata, K.V., Bruns, B.U. & Schmidt, G.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7667-7672, *In vitro reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: Heterodimerization is required for antenna pigment organization.*
- Schmidt, G.W., Bartlett, S.G., Grossman, A.R., Cashmore, A.R. & Chua, N.H. (1981) *J. Cell Biol.* 91, 468-478, *Biosynthetic Pathways of Two Polypeptide Subunits of the Light-harvesting Chlorophyll a/b Protein Complex.*
- Schödel R., Irrgang, K.-D., Voigt, J. & Renger, G. (1998) *Biophys. J.* 75, 3143-3153, *Rate of Carotenoid Triplet Formation in Solubilized Light-Harvesting Complex II (LHCII) from Spinach.*
- Schubert, W.D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H.T., Fromme, P. & Krauß, N. (1998) *J. Mol. Biol.* 280, 297-314, *A common Ancestor for Oxygenic and Anoxygenic Photosynthetic Systems: A Comparison Based on the Structural Model of Photosystem I*
- Settles, A.M. & Martienssen, R. (1998) *Trends Cell Biol.* 8, 494-501, *Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria.*
- Settles, A.M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K. & Martienssen, R. (1997) *Science* 278, 1467-1470, *Sec-Independent Protein Translocation by the Maize Hcf106 Protein.*
- Simonetto R., Crimi, M., Sandona, D., Croce, R., Cinque, G., Breton, J. & Bassi R. (1999) *Biochemistry* 38, 12974-12983, *Orientation of Chlorophyll Transition Moments in the Higher-Plant Light-Harvesting Complex CP29.*
- Simpson, D.J. & Knoetzel, J. (1996) in *Advances in Photosynthesis (4): Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D.R. & Yocum, C.F., Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 493-506, *Light-harvesting Complexes of Plants and Algae: Introduction, Survey and Nomenclature.*
- Smeeckens, S., Weisbeek, P. & Robinson, C. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 73-76, *Protein transport into and within chloroplasts.*
- Spangfort, M. & Andersson, B. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 163-170, *Subpopulations of the main chlorophyll a/b light-harvesting complex of Photosystem II – isolation and biochemical characterization.*

- Staehelin, L.A., Golecki, J.R. & Drews, G. (1980) Biochim. Biophys. Acta 589, 30-45, *Supramolecular organization of chlorosomes (chlorobium vesicles) and of their membrane attachment sites in chlorobium limicola*.
- Standfuß, J. (2000) Diplomarbeit am MPI für Biophysik Frankfurt/M. (W. Kühlbrandt) / Universität Mainz, Institut für Allgemeine Botanik (H. Paulsen), *Untersuchungen zur Stabilität des Trimers von rekombinantem light harvesting complex II*.
- Strain, H.H., Thomas, M.R. & Katz, J.J. (1963) Biochim. Biophys. Acta 75, 306-311, *Spectral absorption properties of ordinary and fully deuterated chlorophylls a and b*.
- Strasburger, E. (1991) *Lehrbuch der Botanik*, G. Fischer Verlag.
- Tardy F. & Havaux M. (1996) J. Photochem. Photobiol. B 34, 87-94, *Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of Arabidopsis thaliana*.
- Telfer A., Oldham T C., Phillips D., Barber J (1999) Journal of Photochemistry & Photobiology. B - Biology. 48, 89-96, *Singlet oxygen formation detected by near-infrared emission from isolated photosystem II reaction centres: Direct correlation between P680 triplet decay and luminescence rise kinetics and its consequences for photoinhibition*.
- Theg, S.M. & Geske, J. (1992) Biochemistry 31, 5053-5060, *Biophysical Characterization of a Transit Peptide Directing Chloroplast Protein Import*.
- Thornber, J.P. & Highkin, H.R. (1974) Eur. J. Biochemistry 41, 109-116, *Composition of the Photosynthetic Apparatus of Normal Barley Leaves and a Mutant Lacking Chlorophyll b*.
- Thornber, J.P. (1995) Photosynth. Res. 44, 3-22, *Thirty years of fun with antenna pigment-proteins and photochemical reaction centers: A tribute to the people who have influenced my career*.
- Thornber, J.P., Gregory, R.P.F., Smith, C.A. & Bailey, J.L. (1967) Biochemistry 6, 391-396, *Studies on the Nature of the Chloroplast Lamella. I. Preparation and Some Properties of Two Chlorophyll-Protein Complexes*.
- Thornber, J.P., Peter, G.F., Morishige, D.T., Gomez, S., Anandan, S., Welty, B.A., Lee, A., Kerfeld, C., Takeuchi, T., Preiss, S., (1993), Biochemical, Society, Transactions 21, 15-18, *Light harvesting in photosystems I and II*.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H.C.P., Ohno, T. & Tanaka, A. (1999) Nature 400, 159-162, *Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts*.
- Trinkunas, G., Connelly, J.P., Müller, M.G., Valkunas, L. & Holzwarth, A.R. (1997) J. Phys. Chem. B 101, 7313-7320, *Model for the Excitation Dynamics in the Light-Harvesting Complex II from Higher Plants*.
- Tu, C.J., Schuenemann, D. & Hoffman, N.E. (1999) J. Biol. Chem. 274, 27219-27224, *Chloroplast FtsY, Chloroplast Signal Recognition Particle, and GTP Are Required to Reconstitute the Soluble Phase of Light-Harvesting Chlorophyll Protein Transport into Thylakoid Membranes*.
- Van Grondelle, R., Dekker, J.P., Gillbro, T., Sundstrom, V. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1187, 1-65, *Energy transfer and trapping in photosynthesis*.
- Veverka, V., Hrabal, R., Dürchan, M. & Stýz, D. (2000) J. Mol. Struct. 523, 281-287, *Studies of phospholipid binding to N-terminal domain of membrane protein light-harvesting complex II*.
- Voet D. & Voet G. J. (1992) *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft.
- Waegemann, K., Paulsen, H. & Soll, J. (1990) FEBS lett. 261, 89-92, *Translocation of proteins into isolated chloroplasts requires cytosolic factors to obtain import competence*.
- Walters, R.G. & Horton, P. (1999) Photosynth. Res. 61, 77-89, *Structural and functional heterogeneity in the major light-harvesting complexes of higher plants*.
- Weiner M.P., Costa G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E., Bauer, J.C. (1994) Gene (Amsterdam) 151, 119-123, *Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction*.
- Weiss, C. (1978) in *The Porphyrins, Vol. III*, Editor: Dolphin, D., Academic Press, 211-223, *Electronic Absorption Spectra of Chlorophylls*.
- Welte, C. Nickel, R., Wild, A. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1231, 265-274, *Three-dimensional crystallization of the light-harvesting complex from Mantoniella squamata (Prasinophyceae) requires an adequate purification procedure*.

- Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C. & Paulsen, H. (1999) *Biochemistry* 38, 16205-16213, *Exchange of Pigment-Binding Amino Acids in Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein*.
- Zer, H., Vink, M., Keren, N., Dilly-Hartwig, H.G., Paulsen, H., Herrmann, R.G., Andersson, B. & Ohad, I. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8277-8282, *Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: Reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of the light-harvesting complex II*.
- Zilberstein J., Bromberg, A., Frantz, A., Rosenbach-Belkin, V, Kritzmman, A., Pfefermann, R., Salomon, Y., Scherz, A. (1997) *Photochem. Photobiol.* 65, 1012-1009, *Light-dependent oxygen consumption in bacteriochlorophyll-serine-treated melanoma tumors: on-line determination using a tissue-inserted oxygen microsensor*.
- Zito, F., Finazzi, G, Delosome, R., Nitschke, W., Picot, D. & Wollman, F.A. (1999) *EMBO J.* 18, 2961-2969, *The Q_O site of cytochrome b_6f complexes controls the activation of the LHCII kinase*.
- Zucchelli, G., Garlaschi, F.M. & Jennings, R. (1996) *Biochemistry* 35, 16247-16254, *Thermal Boradening Analysis of the Light Harvesting Complex II Absorption Spectrum*.